



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS PROGRAMA DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS**



UASLEY CALDAS DE OLIVEIRA

**ANÁLISE EXPLORATÓRIA E PREDITIVA DE LINHAGENS DE
CAUPÍ BASEADA NAS RESPOSTAS OXIDATIVAS À
PRESENÇA DE ALUMÍNIO**

**Feira de Santana – BA
2023**

UASLEY CALDAS DE OLIVEIRA

**ANÁLISE EXPLORATÓRIA E PREDITIVA DE LINHAGENS DE
CAUPÍ BASEADA NAS RESPOSTAS OXIDATIVAS À
PRESENÇA DE ALUMÍNIO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientadora: Profa. Dra. Marilza Neves do Nascimento Ribeiro

Co-orientadora: Profa. Dra. Girlene Santos de Souza

Feira de Santana – BA

2023

Ficha Catalográfica - Biblioteca Central Julieta Carteado - UEFS

O52

Oliveira, Uasley Caldas de

Análise exploratória e preditiva de linhagens de caupí baseada nas respostas oxidativas à presença de alumínio / Uasley Caldas de Oliveira. – 2023.

81 f.: il.

Orientadora: Marilza Neves do Nascimento Ribeiro.

Coorientadora: Girlene Santos de Souza.

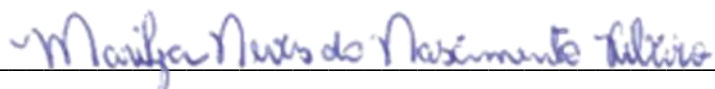
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Feira de Santana, 2023.

1. Feijão-caupí – linhagens. 2. *Vigna unguiculata* (L.) Walp. 3. Alumínio – concentração. 4. Modelagem preditiva. 5. Estresse abiótico. 6. Catalase.
I. Título. II. Ribeiro, Marilza Neves do Nascimento, orient. III. Souza, Girlene Santos de, coorient. IV. Universidade Estadual de Feira de Santana.

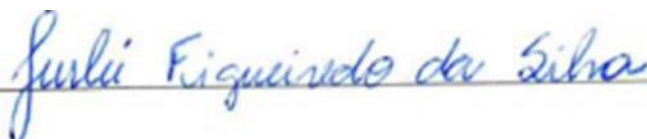
CDU 582.739:546.62

Luis Ricardo Andrade da Silva - Bibliotecário - CRB-5/1790

BANCA EXAMINADORA



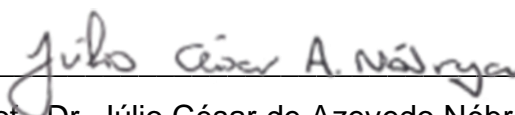
Profa. Dra. Marilza Neves do Nascimento Ribeiro
(Universidade Estadual de Feira de Santana- UEFS)
Orientadora e Presidente da Banca



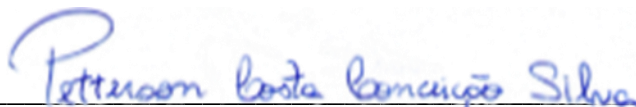
Profa. Dra. Juslei Figueiredo da Silva
(Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Rondônia - IFRO)



Profa. Dra. Aglair Cardoso Alves
(Universidade Estadual do Piauí - UESPI)



Prof. Dr. Júlio César de Azevedo Nóbrega
(Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB)



Dr. Petterson Costa Conceição Silva
(Universidade Federal de Campina Grande - UFCG)

Feira de Santana – BA

2023

Aos meus pais, Antonia e Rudivandro, por todos os ensinamentos e dedicação.

À minha esposa Mercilane e meu filho Pietro, por todo amor e carinho.

DEDICO

AGRADECIMENTO

Primeiramente a Deus, por ser o meu principal orientador e pelas coisas que vem realizando em minha vida.

Aos meus parentes, avó (Cristina) aos meus tios (a), primos (a), que torceram por mim e que me ajudaram sempre que precisei. Em especial aos meus pais e meu irmão, minha esposa e filho que me impulsionaram a chegar nesse objetivo.

Aos meus pais acadêmicos: Anacleto Ranulfo dos Santos, Girlene Santos de Souza e Marilza Neves do Nascimento Ribeiro, por me dar a oportunidade e a liberdade intelectual de fazer minhas pesquisas e por toda confiança que foi depositada em mim, fornecendo tudo o que era preciso ao desenvolvimento dos trabalhos e pela amizade que construímos juntos.

A todas as pessoas que fazem parte da Unidade do Horto Florestal da UEFS, aos funcionários de campo, Marcos, André, Edivaldo, Antônio Carlos, Marivaldo, Sandra, Claudia, ao Coordenador Marcos, e aos demais funcionários, professores e estudantes.

De maneira especial deixo meus sinceros agradecimentos aqueles que considero como irmãos, Ronaldo de Jesus Caldas e Luiz Alberto Conceição Caldas (*In memoriam*) e ao meu grande amigo Janderson que me acompanha desde o primeiro dia da graduação, uma amizade que já dura uns dez anos, obrigado por tudo.

Ao corpo docente da UEFS. E a todos os funcionários que estiveram sempre presentes, nos auxiliando no que fosse preciso.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“Ninguém vai bater mais forte do que a vida. Não importa como você bate e sim o quanto aguenta apanhar e continuar lutando, o quanto pode suportar e seguir em frente. É assim que se ganha.”

(Sylvester Stallone)

RESUMO

A toxidez causada por alumínio é um fator limitante de grande importância no cultivo do feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L.), leguminosa cultivada nas regiões tropicais e subtropicais, considerada uma importante fonte alimentar, principalmente pela sua importância nutricional e socioeconômica para pequenos agricultores das regiões Norte e Nordeste do Brasil. Objetivou-se com esse trabalho avaliar linhagens de feijão-caupi quanto a tolerância ao íon alumínio com base na atividade específica de enzimas antioxidantes aplicando modelagem preditiva. O experimento foi conduzido na Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), no Laboratório de Germinação de Sementes (LAGER) e em casa de vegetação. Foi realizada avaliação do teor de proteína e da atividade específica da enzima ascorbato peroxidase (APx), catalase (CAT), peroxidase (POD) e superóxido dismutase (SOD) nas plantas expostas a diferentes concentrações de alumínio. Para análise dos resultados obtidos foram utilizadas diferentes formas de classificação quanto a tolerância ao alumínio, desde testes de médias utilizando o Scott-Knott a ($p \leq 0,05$) de probabilidade, assim como, a modelagem preditiva agregada em árvore de dados onde foi testado os modelos preditivos Random Forest, Tree, Rede Neural e kNN. Foi utilizado o corante *Evans blue* como um indicador visual da toxidez de alumínio bem como sua quantificação através de leitura em espectrofotômetro. Observou-se grande variabilidade genética entre as linhagens de feijão-caupi quanto à tolerância ao alumínio. Os dados da atividade enzimática das plantas expostas ao íon alumínio foi possível determinar que o modelo *Random Forest* e o *Neural Network* para as imagens com o corante Evans Blue, apresentaram melhor capacidade preditiva para ambos os dados estudados. Pelo método visual utilizando o corante Evans blue a linhagem O foi a mais tolerante e as linhagens I, J, F, G e M foram as mais sensíveis ao alumínio quando analisado a coloração do ápice radicular. Já a quantificação do Evans blue as linhagens D e C foram as mais tolerantes e as linhagens mais sensíveis foram a G e A.

Palavras-chave: *Vigna unguiculata* L. Walp. Estresse abiótico. Aprendizado de máquina, Espécies reativas de oxigênio. Catalase. Random Forest.

ABSTRACT

Aluminum toxicity is a significant limiting factor in cowpea (*Vigna unguiculata* L.) cultivation, a legume grown in tropical and subtropical regions, highly valued as a food source, particularly for its nutritional and socio-economic importance to small-scale farmers in the North and Northeast regions of Brazil. The objective of this study was to assess cowpea lineages for aluminum ion tolerance based on the specific activity of antioxidant enzymes using predictive modeling. The experiment was conducted at the State University of Feira de Santana (UEFS), in the Seed Germination Laboratory (LAGER), and in a greenhouse. Evaluation of protein content and the specific activity of the enzymes ascorbate peroxidase (APx), catalase (CAT), peroxidase (POD), and superoxide dismutase (SOD) was performed on plants exposed to different aluminum concentrations. Various forms of aluminum tolerance classification were used to analyze the results, including mean tests using Scott-Knott with a probability level of $p \leq 0.05$. Additionally, predictive modeling was employed, incorporating data trees, where predictive models like Random Forest, Tree, Neural Network, and kNN were tested. Evans blue dye was utilized as a visual indicator of aluminum toxicity, and its quantification was done through spectrophotometry. Significant genetic variability was observed among cowpea lineages concerning aluminum tolerance. The enzyme activity data from plants exposed to aluminum ions enabled the determination that the Random Forest and Neural Network models for images with Evans Blue dye displayed the best predictive capability for both data sets. Using the visual method with Evans blue dye, lineage O demonstrated the highest tolerance, while lineages I, J, F, G, and M were the most sensitive to aluminum, as determined by root apex coloration. Regarding Evans blue quantification, lineages D and C were the most tolerant, and the most sensitive lineages were G and A.

Keywords: *Vigna unguiculata* L. Walp. ral, Abiotic stress, Machine Learning, Reactive Oxygen Species. Catalase, Random Forest.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação dos códigos das linhagens de acordo com suas classes... 41	41
Tabela 2. Resultados de algoritmos de classificação de teste..... 47	47
Tabela 3. Desdobramento da interação entre linhagens de feijão-caupi dentro das concentrações de alumínio para o acúmulo do corante Evans Blue no ápice radicular. 72	72
Tabela 4. Resultados de algoritmos de classificação de teste..... 75	75

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Abundância e especiação de alumínio na crosta terrestre. (A) Diferentes formas de Al no solo e na água, (B) Especiação de Al na solução do solo.	20
Figura 2. Efeito do Al no comprimento da raiz primária de plantas sensíveis e tolerantes.	22
Figura 3. Obtenção da curva padrão de proteínas utilizando-se como padrão Soro Albumina Bovina BSA (1 mg mL ⁻¹).	43
Figura 4. Modelos de validação cruzada utilizados na mineração de dados não supervisionados.	45
Figura 5. Análise da curva característica de operação do receptor para o escore tempo de exposição ao íon alumínio para predição do melhor modelo.	48
Figura 6. Número de instâncias das instâncias classificadas correta e incorretamente numericamente para o modelo Random Forest.	50
Figura 7. Dendrograma da análise de cluster (Distância Euclidiana) do teor de proteína e a atividade específica das enzimas antioxidantes.	51
Figura 8. Dendrograma resultante da análise hierárquica de agrupamentos mostrando a formação de grupos segundo o teor de proteína e a atividade específica de enzimas antioxidantes com base nas linhagens e doses de alumínio nos tempos 0, 2, 4 e 6 dias.	53
Figura 9. Classes de acúmulo de Al em raízes, adaptadas para feijão-caupi, por meio do teste de coloração com Evans blue em ápices radiculares. (A) Coifa; (B) Meristema apical (região de divisão celular) e região de alongamento celular; (C) Região de maturação (região basal).	66
Figura 10. Obtenção da curva padrão com diferentes concentrações do corante Evans Blue.	67
Figura 11. Modelos de validação cruzada utilizados na mineração de dados não supervisionados.	67
Figura 12. Detecção de morte celular por meio do teste de coloração com Evans Blue em ápices radiculares de linhagens de feijão-caupi após exposição ao alumínio por 5 dias em B.O.D. Todas as imagens foram constituídas por raízes do tratamento controle seguida daquelas submetidas a concentrações crescentes de Al.	70

Figura 13. Desdobramento da interação das concentrações de alumínio dentro das linhagens de feijão-caupi para o acúmulo do corante Evans Blue no ápice radicular. Feira de Santana-BA, 2019.	74
Figura 14. Análise da curva característica de operação do receptor para concentração do íon alumínio.	76
Figura 15. Matriz de confusão com os números de instâncias dos classificadores correta e incorretamente do modelo Neural Network.	77

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

°C – Grau Celsius	K – Potássio
¹O₂ – Oxigênio singlete	K⁺ – Potássio monovalente
Al – Alumínio	Mg – Magnésio
Al(OH)₃ – Hidróxido de alumínio	mg dm⁻³ – miligrama por decímetro cúbico
Al³⁺ – Alumínio trivalente	Mg²⁺ – Magnésio divalente
AlF²⁺ – Difluoreto de alumínio	NBT – Nitro blue tetrazólio
AlSO₄⁺ – Sulfato de alumínio	NH₄⁺ – Amônio
AP_x – Enzima ascorbato peroxidase	NO₂ – Dióxido de nitrogênio
ATP – Adenosina trifosfato	NO₃⁻ – Nitrato
B.O.D – Demanda Bioquímica de Oxigênio	O₂ – Oxigênio
Ca – Cálcio	O₂^{-•} – Ânion superóxido
Ca²⁺ – Cálcio divalente	OH[•] – Radical hidroxila
CAT – Enzima catalase	P – Fósforo
cm – Centímetros	POD – Enzima peroxidase
CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento	SO₂ – Dióxido de enxofre
CV – Coeficiente de variação	SOD – Enzima superóxido dismutase
DHAR – Enzima dehidroascorbato redutase	W – Watts
DMSO – Dimetilsulfóxido	λ – Comprimento de onda
EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária	μL – Microlitro
EROs – Espécies reativas de oxigênio	
FAO – Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura.	
FV – Fonte de variação	
GL – Grau de liberdade	
H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio	
HO₂^{-•} – Radical peridroxil	

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	16
REVISÃO DE LITERATURA.....	18
<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.)	18
Alumínio no solo	19
Toxicidade do alumínio e seu efeito na morfologia das plantas	21
Toxidez do alumínio a nível celular	21
Efeitos do alumínio na absorção de nutrientes	23
Mecanismos de tolerância ao alumínio	24
Uso de corantes nas pesquisas sobre fitotoxidez por alumínio	25
Estresse oxidativo.....	26
REFERÊNCIAS	27
CAPÍTULO I.....	37
AVALIAÇÃO DE MODELOS PREDITIVOS NA SELEÇÃO DE LINHAGENS DE FEIJÃO-CAUPI QUANTO A TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO	37
ABSTRACT.....	38
RESUMO	38
INTRODUÇÃO.....	40
MATERIAL E MÉTODOS	41
Implantação e condução do experimento	42
Preparação do extrato enzimático	42
Quantificação de Proteína.....	43
Atividade da Ascorbato Peroxidase (APx, EC 1.11.1.11).....	43
Atividade da Catalase (CAT, EC 1.11.1.6).....	44
Atividade da Guaiacol Peroxidase (POD, E.C.1.11.1.7).....	44
Atividade da Superóxido Dismutase (SOD, EC 1.15.1.1).....	44
Modelagem preditiva	45
Test and Score (Teste e pontuação).....	45
Random Forest.....	46
Tree	46
kNN	46
Rede Neural (Neural Network).....	46
Análise de Agrupamento	46
RESULTADOS E DISCUSSÃO	47

CONCLUSÕES	54
REFERÊNCIAS	55
CAPÍTULO II.....	60
MODELAGEM BASEADA EM IMAGEM NA SELEÇÃO DE LINHAGENS DE FEIJÃO-CAUPI AO ALUMÍNIO	60
ABSTRACT.....	61
RESUMO	62
INTRODUÇÃO.....	63
MATERIAL E MÉTODOS	65
Experimento	65
Germinação.....	65
Detecção de células em processo de morte celular	66
Quantificação de danos à membrana / morte celular usando a técnica de coloração Evans blue	66
Modelagem preditiva	67
Image Embedding (Incorporação de imagens)	68
Test and Score (Teste e pontuação)	68
Random Forest.....	68
Tree	68
kNN	68
Rede Neural (Neural Network).....	69
Análise estatística	69
RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
CONCLUSÕES	77
REFERÊNCIAS	77

INTRODUÇÃO GERAL

A acidez do solo tem um papel importante na produtividade agrícola e conseqüentemente nas práticas de manejo do solo, interferindo na quantidade e disponibilidade de nutrientes para as plantas pela diminuição ou aumento da solubilidade de nutrientes essenciais, sendo de fundamental importância a sua correção através do uso de calcário.

A presença de alumínio em ambientes ácidos promove a disponibilidade do íon alumínio na sua forma tóxica aos vegetais, limitando assim o seu desenvolvimento. Diante disso, a busca por espécies tolerantes ao alumínio surge como uma alternativa para mitigar os danos causados a produção, pois, muitas vezes pode ser uma opção economicamente viável para os produtores menos capitalizados, além de problemas relacionados a correção apenas das camadas superficiais, não sendo efetivo na correção da acidez do subsolo, devido à baixa mobilidade dos componentes solúveis do calcário aplicado na superfície do solo

O processo de acidificação se dá devido a algumas práticas agrícolas, como a exportação de produtos da fazenda, lixiviação de nitrogênio abaixo da zona de raiz, uso indiscriminado de fertilizantes nitrogenados e excesso de matéria orgânica.

A toxidez do alumínio é um dos principais fatores limitantes do desenvolvimento das plantas em solos ácidos, principalmente quando não é utilizado corretivos da acidez do solo. Com isso o desenvolvimento de genótipos tolerantes ao alumínio tem sido uma alternativa para mitigar os danos causados pelo íon alumínio. Assim as investigações dos mecanismos de tolerância bem como as bases genéticas deste elemento têm merecido atenção especial pela pesquisa científica (HARTWIG et al., 2007).

O estresse causado pelo íon Al^{3+} , o cultivo hidropônico oferece várias vantagens aos estudos da interação desse elemento com as plantas, como o pronto acesso ao sistema radicular e a possibilidade de monitoramento e controle de pH e das concentrações de Al e de outros íons relevantes à expressão de reações com alta sensibilidade e tolerância (ROSSIELLO; JACOBNETTO, 2006).

Essa condição de estresse, pode promover uma grande produção de espécies reativas de oxigênio que apesar de desempenharem um papel importante na manutenção do crescimento, principalmente quando em situação de estresse. Algumas plantas podem sofrer alterações fisiológicas, bioquímicas e morfológicas quando em contato com o íon alumínio. Essa exposição pode variar de espécies para espécie e até mesmo de indivíduos da mesma espécie.

Diversos estudos tentam elucidar qual o melhor método para identificar indivíduos mais tolerantes ao alumínio. Diante disso, um ramo de *Machine Learning* (Aprendizagem de máquinas), tem se destacado ao longo dos anos. Essa ferramenta possui diversos métodos de avaliação dinâmica com a possibilidade de criação de sistemas de predição, possibilitado assim um grande avanço na avaliação contínua de plantas frente as mudanças nos padrões fisiológicos, morfológicos e bioquímicos, pois o modelo não é adaptado, mas treinado.

REVISÃO DE LITERATURA

***Vigna unguiculata* (L.) Walp.)**

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), também conhecido como “feijão-de-corda” e “feijão-macassar”, é uma leguminosa, muito cultivada nas regiões tropicais e subtropicais como principal fonte de alimento, isso se deve ao seu elevado valor nutritivo, constituindo de grande importância socioeconômica para a população das regiões Norte e Nordeste do Brasil (SILVA et al. 2002; FREIRE FILHO, 2011).

É uma das fontes de alimento humano mais antiga, seu cultivo data desde o período Neolítico (SUMMERFIELD et al., 1974). Entretanto, não se tem um centro de origem conhecido (SARIAH, 2010) porém devido, a grande diversidade genética juntamente com a presença de alguns exemplares selvagens encontrados somente na África do Sul, faz desta região o seu provável centro de domesticação (FARIS, 1965; FREIRE FILHO 1988).

A principal utilização para consumo é *in natura*, principalmente na forma de grãos secos ou verdes, o feijão-caupi é utilizado também como adubação verde, proteção do solo e ainda na alimentação animal como forragem, feno, ensilagem e farinha (ROCHA et al., 2009).

Nascimento et al. (2011), relatam que o feijão-caupi (*V. unguiculata* L. Walp.), também conhecido como “feijão-de-corda” e “feijão-macassar”, representa uma das principais fontes alimentares das regiões norte e nordeste do Brasil, sendo considerado um alimento básico para a população de baixa renda. Além de sua importância nutritiva, gera emprego e renda para essas regiões (FREIRE FILHO, 2011).

O Brasil tem destaque ao ocupar o terceiro lugar, constituindo -se um dos maiores produtores mundiais de feijão-caupi, ficando atrás somente da Nigéria (2,6 milhões de toneladas) e do Níger (2,4 milhões de toneladas) (FAO, 2020). De acordo com a Embrapa (2020), no Brasil a cultura é cultivada em uma área de 1.099,560 ha⁻¹, com uma produção de 512 toneladas e rendimento de 466 kg ha⁻¹, sendo, os estados que se destacam na produção são o Piauí e a Bahia, que quando são somados sua produção correspondem a 86 % do total da safra 2020/21 (CONAB, 2021).

O feijão-caupi fornece grãos nutritivos que contêm em média 25% de proteína, Afoakwa et al. (2006), afirmam que possuem alta digestibilidade além de vitaminas, fibras solúveis e minerais que proporcionam reduções no colesterol e no controle da diabetes, melhorando assim os aspectos relacionados de saúde, além de apresentar um baixo custo de produção (FAO, 2016).

Essa cultura é vista como um destaque principalmente nas regiões tropicais e subtropicais (Kirigia et al., 2018), isso se deve a grande capacidade de plasticidade fenotípica que possibilita uma maior adaptação a condições adversas, principalmente déficit hídrico, altas temperaturas embora nem todas as cultivares respondam no da mesma forma (ALVES-BARROS et al., 2013; ABDELATI et al., 2015).

Apesar de ser uma planta bem adaptada as condições áridas Gull et al., (2019) ressaltam que o período que possibilita uma maior sensibilidade ao déficit hídrico é na floração. Meena et al., (2015), corroboram afirmando que o déficit hídrico nesse estágio vegetativo afeta drasticamente o rendimento de grãos.

Santos et al., (2021), ressaltam a importância da interação entre o potencial produtivo e os fatores edafoclimáticos, principalmente por fatores de solo e adubação, apresenta um sistema radicular pouco profundo e o ciclo curto da culta faz com que ela seja uma planta exigente em nutrientes.

Alumínio no solo

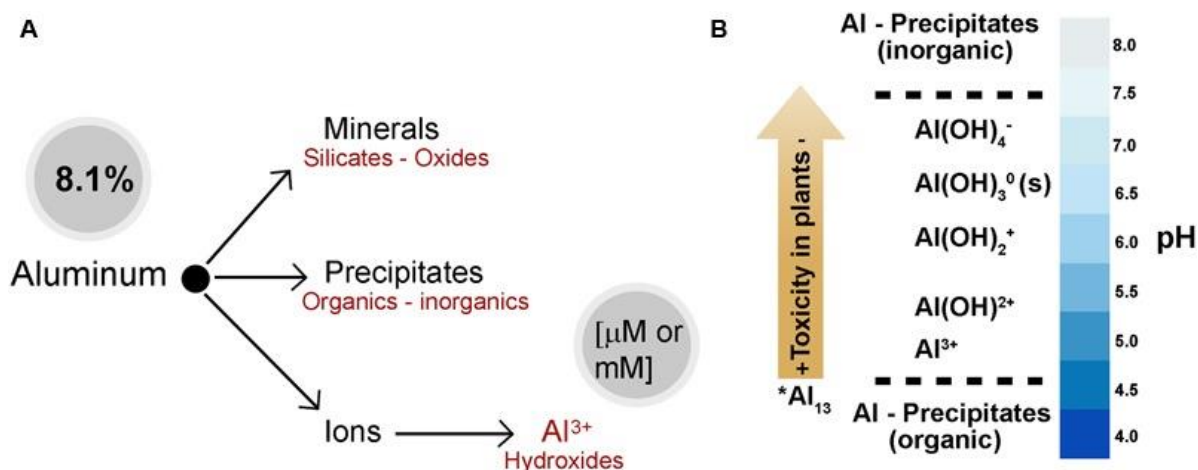
Trata-se de um elemento anfótero que pode atuar como cátion em meio ácido e como ânion em meio básico, tendo sua disponibilidade no solo controlada pelo pH (ERTSCH; PARKER, 1995). Quando em meio ácido, levando em consideração um pH menor do que 5,0, o alumínio apresenta-se na forma trivalente como hexahidrato octaedral ($\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$) (WRIGHT, 1989). Onde são encontrados cerca de 90% do alumínio na forma tóxica para a grande maioria dos vegetais.

Como o alumínio no solo é altamente dependente do pH, isso faz com que ele possa se ligar a outros íons ou compostos que passa a possuir características insolúveis como o sulfato (AlSO_4^+), fluoreto (AlF^{2+}), fosfato ($\text{AlH}_2\text{PO}_4^{2+}$), ligantes orgânicos (Al-orgânico), polímeros (polinúcleos de Al) e hidróxidos (AlOH_2^+ ,

Al(OH)_2^+ , Al(OH)_3 e Al(OH)_4^-), sendo essas formas não tóxicas aos vegetais (DELHAIZE; RYAN, 1995; BLOOM; ERICH, 1996),.

Pelo fato de o alumínio ser trivalente na sua forma mais danosa aos vegetais, no solo ele é fortemente atraído pelas partículas coloidais do solo pelo fato de estar a permanecer em sua grande maioria de na forma eletronegativa. Entretanto esse tipo de interação proporciona uma competição com outros cátions como o K^+ uma e Ca^{2+} e Mg^{2+} duas valências, sendo assim facilmente perdidos por processos de lixiviação (BOHNEN, 2000).

O Al é o metal mais abundante no solo, com aproximadamente 8,1%, depois do oxigênio e silício (Figura 1A), uma vez que, a maior parte está na forma de um mineral (aluminossilicatos e óxidos de alumínio), entretanto quando na solução do solo e por ser um elemento anfótero em diferentes pH, o alumínio pode hidrolisar as moléculas de água formando assim hidróxido de alumínio (BOJÓRQUEZ-QUINTAL et al., 2017).



Fonte: (Bojórquez-Quintal et al., 2017).

Figura 1. Abundância e especiação de alumínio na crosta terrestre. (A) Diferentes formas de Al no solo e na água, (B) Especiação de Al na solução do solo.

Tendo em vista que o Brasil possui cerca de 60% dos seus solos apresentando níveis mais elevados de acidez, em geral variam de 3,7 a 5,5 e com níveis significativos de Al^{3+} (ABREU Jr. et al., 2003). O que acaba sendo de grande preocupação por parte dos agricultores por ser um fator limitante do sistema radicular.

Em solos neutros ou moderadamente ácidos, o alumínio (Al) é encontrado principalmente na forma de compostos insolúveis (HUANG et al., 2021).

Entretanto quando encontrado em solos com acidez menor que 4,5 (Figura 1B), tende a solubilizar como cátions mononucleares, ocasionando assim fitotoxidez para a maioria das plantas, e em alguns casos mesmo em baixa concentração (MA et al., 2014).

Toxicidade do alumínio e seu efeito na morfologia das plantas

Quando o solo se encontra em condições ácidas ocorre a prevalência do íon alumínio na forma trivalente, proporcionando assim uma inibição do alongamento da raiz primária e da divisão celular que, conseqüentemente, vai prejudicar todo o crescimento e produtividade do vegetal (KOCHIAN et al., 2004; KAR et al., 2021).

Quando em condições de excesso o alumínio inibe o crescimento e causa alterações na conformação do sistema radicular, tornando as raízes engrossadas, inchadas, com coloração marrom, menos ramificadas, quebradiças e com pontuações escuras nas extremidades (EPSTEIN; BLOOM, 2006).

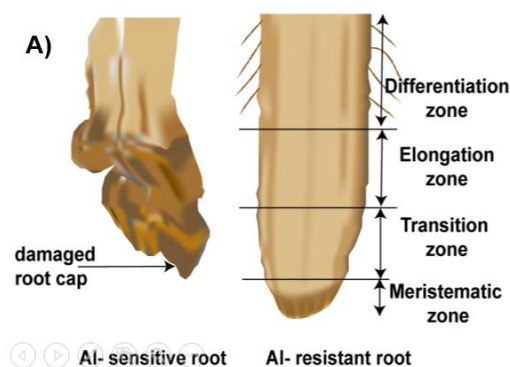
Guo et al., (2007), relatam que o influxo e efluxo são uma interação muito importante na determinação da taxa de alongamento celular quando a plantas estão na presença do íon alumínio.

Toxidez do alumínio a nível celular

Quando as plantas são submetidas ao íon alumínio diversas são as possibilidades que esse íon pode interferir a nível celular, entretanto, é destacado na literatura que quando a célula vegetal fica exposta ao alumínio ocorrem danos à integridade da membrana plasmática (KAR et al., 2021).

As primeiras respostas celulares podem ocorrer quando a planta fica exposta em um intervalo de tempo de 5 a 10 minutos alterando o movimento e o suprimento de cátions em contrapartida facilita a entrada de ânions através da membrana plasmática (RENGEL; ZHANG 2003). Com base nisso Blamey et al., (1990), afirmam que quanto maior for essa capacidade de troca catiônica mais tolerante será a planta. Uma vez dentro da célula o alumínio é capaz de promover o bloqueio da divisão celular (mitose), que conseqüentemente reduz a

produção de novas células (Figura 2A), redução de atividades enzimáticas, entre elas a ATPase, que por consequência bloqueia a liberação de energia principalmente para o processo de absorção ativa de nutrientes (ANGHINONI; MEURER, 1999).



Fonte: (Adaptado: KAR et al., 2021).

Figura 2. Efeito do Al no comprimento da raiz primária de plantas sensíveis e tolerantes.

O tecido celular sofre a influência do alumínio tanto internamente quanto externamente. Quando em contato com o sistema radicular pode ocorrer alterações morfológicas como fator secundário devido aos danos causados pelas alterações celulares. O alumínio danifica a cobertura da raiz proporcionando o engrossamento radicular, isso ocorre devido ao alumínio ligar-se e regular os componentes como pectina e hemicelulose que estão presentes na parede celular (KAR et al., 2021).

Yang e Horst (2015) afirmam que essas alterações na estrutura e propriedades da parede celular vão atuar como um fator crítico no desenvolvimento da raiz primária quando na presença do alumínio. Além da redução no crescimento podem ocorrer rupturas transversais da parede cortical externa à parede cortical interna, devido à ligação da parede celular com o Al, ocasionando assim a diminuição da plasticidade celular (KOPITTKE et al., 2008).

Todos esses fatores podem refletir na eficiência fotossintética, peroxidação lipídica, danos ao DNA, danos ao citoesqueleto e aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (Bojórquez-Quintal et al., 2017). Entretanto, alguns autores afirmam que quando em baixas concentrações o alumínio pode promover alguns efeitos benéficos como: aumento na biomassa da raiz, promoção da absorção de nutrientes, aumento da defesa contra

patógenos, modulação da cor floral e aumento da atividade metabólica (BOJÓRQUEZ-QUINTAL et al., 2017; SUN et al., 2020).

Quando plantas são submetidas a concentrações letais de alumínio ocorrem alterações nas membranas celulares, o que conseqüentemente aumenta sua permeabilidade, aumentando juntamente o efluxo de solutos do interior das células. A peroxidação lipídica constitui um dos primeiros efeitos sobre a bicamada, atuando na degeneração dos canais de proteínas de membranas e no potencial elétrico da parede celular que sofre alterações (SHOMER et al., 2003; VITORELLO et al., 2005). Também pode deslocar íons críticos no apoplasto promovendo a interrupção de concentrações iônicas intracelulares no momento em que são direcionados para transportadores de solutos localizados na membrana (canais iônicos, transportadores e bombas) que transportam solutos carregados através da membrana (KAR et al., 2021).

Efeitos do alumínio na absorção de nutrientes

O principal dano que o alumínio causa nos vegetais é o dano radicular causado pela exposição prolongada ao íon, o que pode dificultar a absorção de nutrientes e água que conseqüentemente influenciará no crescimento da planta (JONES; KOCHIAN, 1995; BARCELÓ; POSCHENRIEDER, 2002).

Portanto quando ocorre uma alteração no pH do solo e o mesmo tende a ficar mais ácido ocorre assim uma maior disponibilidade do íon alumínio, saindo de uma forma não lábil para uma forma lábil. Sendo assim uma maior predominância de íons de alumínio na sua forma trivalente vão promover uma interação com elementos que na sua grande maioria são cátions como: cálcio (Ca^{2+}), magnésio (Mg^{2+}), potássio (K^+) e amônio (NH_4^+), dentre outros, com isso pode ocasionar estresse oxidativo, alteração no citoesqueleto, alterações significativas na parede celular, interrupções nas vias de sinalização, alterações da polarização da membrana plasmática, até mesmo danos ao DNA do vegetal (RYAN; KOCHIAN, 1993; BLANCAFLOR et al., 1998; SIVAGURU et al., 1999; LIU; LUAN, 2001; BOSCOLO et al., 2003; YAMAMOTO et al. 2003; KOCHIAN et al., 2005; TAMAS et al., 2005; ÍLLES et al., 2006; GUPTA et al., 2013).

Kar et al., (2021) trazem uma visão geral de como o alumínio interfere nas atividades de vários transportadores de soluto, sendo que em altas

concentrações desse íon as plantas acabam sendo prejudicadas nas funções exercidas por K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , amônio NH_4^+ e nitrato NO_3^- , principalmente no sistema radicular, que por vez vai resultar em um influxo de íons de forma desproporcional. Dessa forma muitas das vezes os vegetais não são capazes de expressar um sintoma de fitotoxicidade em relação ao alumínio, e sim podem apresentar, apresentar um desequilíbrio nutricional em função da absorção limitada e/ou desproporcional.

Freitas et al., (2006) ao estudar a absorção de P, Mg, Ca e K e tolerância de genótipos de arroz submetidos a estresse por alumínio em sistemas hidropônicos verificaram que existe uma interação significativa quando foi aumentada a concentração de alumínio na solução nutritiva ocorreu um decréscimo na absorção dos P, Mg, Ca e K.

A acidez da acidez é um fator limitante ao crescimento dos vegetais principalmente cultivados, uma vez nessas condições o Al^{3+} contribui de forma significativa ainda não somente em relação a acidez do solo e sim na interação com outros fatores como aumento da concentração de H^+ , Al^{3+} e Mn^{2+} e decréscimo das concentrações dos cátions Mg^{2+} , Ca^{2+} , K^+ e solubilidade de P e Mo.

Mecanismos de tolerância ao alumínio

O mecanismo de tolerância ao alumínio pode variar de espécie para espécie, entretanto é relatado na literatura a existência de dois mecanismos que conferem tolerância aos vegetais quando expostos ao alumínio. Como por exemplo, a quelatação do íon no citosol da célula, ou então, a exsudação de substâncias orgânicas radiculares, estas quando exsudadas, são capazes de complexar o alumínio na rizosfera da planta (TAYLOR, 1988b).

Rodrigues et al., (2006), evidenciaram que em genótipos de café alguns indivíduos dentro da mesma espécie podem apresentar comportamentos diferentes quando expostos ao alumínio. No estudo foi observado o genótipo Catuai consegue manter as concentrações fixas de alumínio na parte aérea e no sistema radicular, essa concentração de alumínio é proporcional ao aumento da concentração de alumínio. Já o genótipo Icatu consegue manter as concentrações de alumínio fixas no sistema radicular e transportando para a

parte aérea. Fica evidente que o genótipo Catuai apresenta mecanismo de tolerância de exsudatos no sistema radicular, ao passo que, o genótipo Icatu apresenta ação de enzimas antioxidantes que estão agindo no mesmo órgão.

Esse efeito pode ser explicado por mecanismos de compartimentalização do Al em órgãos não fotossintetizantes. Isso pode ocorrer pela diminuição da ação de transportadores de membranas para levar esse elemento para o xilema ou pela compartimentalização dele no vacúolo da célula.

Huang et al., (2021), estudando plantas de *Camellia sinensis*, constataram que essa espécie possui mecanismo internos que possibilita a formação de complexos não tóxicos do alumínio no citosol. No mesmo estudo foi verificado um acúmulo de alumínio na parte aérea principalmente nas folhas mais velhas. Essas estratégias de desintoxicação do alumínio podem contribuir de forma significativa na busca por genótipos mais tolerantes a esse elemento principalmente quando cultivadas em solos ácidos.

A tolerância ao alumínio é uma característica que confere adaptação das plantas em certos ambientes adversos, podendo representar produtividade de grão nos genótipos portadores do caráter para tolerância, quando comparados àqueles que não apresentam. A compreensão dos mecanismos que identificam o desempenho diferencial entre os genótipos facilita a exploração da variabilidade genética existente para o caráter (PASSOS et al., 2015).

Diversos são os mecanismos que a planta possui para mitigar os efeitos deletérios que o alumínio pode causar. Taylor (1988a) e Kochian et al., (2004), relataram que alguns vegetais podem possuir a capacidade de complexação extracelular desse íon com a emissão de ácidos orgânicos, exsudação de quelantes e até mesmo o efluxo do íon, impedindo assim a entrada do íon pelo sistema radicular, podendo também ser complexado na parede celular através da permeabilidade seletiva da membrana plasmática, e com a formação de uma barreira de pH na rizosfera da planta.

Uso de corantes nas pesquisas sobre fitotoxidez por alumínio

Durante as últimas décadas os pesquisadores desenvolveram pesquisas no intuito de elucidar as formas e a utilização de corantes como indicadores de possíveis lesões nas estruturas morfológicas ou até mesmo a nível celular surge

como uma alternativa simples e rápida. Várias são a possibilidade de corantes dentre estes temas: a hematoxilina, corante que produz coloração violeta quando complexado com o íon alumínio. Os primeiros autores a propor a utilização da hematoxilina foram Polle et al., (1978) sendo muito utilizado para gramíneas como recomendado por Rossiello e Jacob-Netto (2006).

O corante azul de evans é uma técnica simples e confiável para determinação de morte celular em microscopia, diante disso foi desenvolvido um procedimento espectrofotométrico para que fosse possível uma melhor quantificação da morte celular principalmente na interação patógeno/hospedeiro e posteriormente adaptado para ensaios com discos foliares (JACYN; MOCK (1994).

A técnica de coloração do sistema radicular de plantas expostas ao íon alumínio é possível verificar que quanto maior for a absorção do corante, maior será a lesão causadas no sistema radicular, entretanto com mais absorção aparente em alguns genótipos mais sensíveis do que em genótipos mais tolerantes (PANDEY; DUBEY, 2022).

Estresse oxidativo

As espécies reativas de oxigênio são moléculas altamente oxidantes e compreendem: o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio singlete (1O_2), radical peridroxil ($HO_2^{\bullet-}$) e radical hidroxila (OH^{\bullet}) (GILL; TUTEJA, 2010). A compreensão desses mecanismos de defesa antioxidante é essencial não apenas para a resistência ao estresse, mas também para o desenvolvimento de estratégias de proteção de culturas e o aprimoramento das práticas agrícolas (BARBOSA et al., 2023).

Segundo Carrillo e Valle (2005), as alterações no metabolismo vegetal sofrem influência principalmente dos fatores ambientais que são capazes de produzir estresse oxidativo, sendo estes classificados como fatores em abióticos como: alta irradiância, seca, deficiência mineral, baixas e altas temperaturas e bióticos: infecção bacteriana, fúngica ou viral, herbicidas, fungicidas, contaminantes atmosféricos (SO_2 , NO , NO_2 , ozônio) e metais pesados como alumínio, cádmio, chumbo entre outros.

No intuito de mitigar esse estresse causado pelos radicais livres, os vegetais podem apresentar uma grande quantidade de mecanismos de defesa como: síntese de compostos antioxidantes não-enzimáticos, como alfa-tocoferol e carotenoides, e enzimáticos como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a peroxidase do ascorbato (APx), dentre outras (ANDERSON; PRASAD, 1995; NOCTOR; FOYER, 1998).

Dado que o estresse oxidativo que estão intimamente ligados aos efeitos adversos de elementos tóxicos que prejudicam várias culturas agrícolas, há a hipótese de que as plantas de caupi com potencial produtivo apresentem respostas diferenciadas por meio da ativação de enzimas envolvidas na resposta ao estresse oxidativo. Portanto, a investigação do metabolismo de defesa do caupi assume um papel de suma importância tanto no setor agroindustrial quanto na pesquisa acadêmica. Essas abordagens têm o potencial de identificar marcadores bioquímicos que podem ser utilizados na seleção de novas variedades resistentes à toxicidade do alumínio, acelerando, assim, os esforços de pesquisa em melhoramento genético e desenvolvimento nessa área.

REFERÊNCIAS

ABDELATI, Y.; EL-SHAIENY, ABDEL-HALEEM.; EL-DAMARANY, A. M.; RASHWAN, A. M. Stability analysis of components characters in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp). **Journal of Horticulture and Forestry**. 7. 24-35. 2015.
<https://doi.org/10.5897/JHF2013.0330>

AFOAKWA, E. O.; YENYI, S. E.; SAKYI-DAWSON, E. Response surface methodology for optimizing the pre-processing conditions during canning of a newly developed and promising cowpea (*Vigna unguiculata*) variety. **Journal of Food Engineering**. 73(4), 346-357. 2006.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.01.037>

ALVES-BARROS, M.; ROCHA, M. M.; GOMES, R. L. F.; DAMASCENO, K. J.; NEVES, S. A. C. Adaptabilidade e estabilidade produtiva de feijão-caupi de porte semi-prostrado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 4, p. 403-410, 2013. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2013000400008>

ANDERSON, D; PRASAD, K; STEWART, R. Changes in isozyme Profiles of catalase, peroxidase and Glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. **Plant Physiology**, 109: 1247 – 1257. 1995.

ANGHINONI, I.; MEURER, E.J. **Eficiência de absorção de nutrientes pelas raízes. In: Workshop sobre sistema radicular: metodologias e estudo de casos.** Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 1999. 300p.

BARBOSA, M. R.; SOUZA, L. M.; NASCIMENTO, K. R. P. Ros e o estresse oxidativo por seca em plantas. **Multidisciplinary Sciences Reports**, 3(3). 2023. <https://doi.org/10.54038/ms.v3i3.44>

BARCELÓ, J.; POSCHENRIEDER C. Fast root growth responses, root exudates and internal detoxification as clues to the mechanisms of aluminum toxicity and resistance: a review. **Environmental and Experimental Botany** 48: 75–92. 2002. [https://doi.org/10.1016/S0098-8472\(02\)00013-8](https://doi.org/10.1016/S0098-8472(02)00013-8)

BERTSCH, P. M.; PARKER, D. R. **Aqueous polynuclear aluminum species.** In: SPOSITO, G. (Coord.). The environmental chemistry of aluminum. Boca Raton: CRC Press, 1995. p. 117-168.

BLAMEY, F. P. C.; EDMEADES, D. C.; WHEELER, D. M. Role of root cation-exchange capacity in differential aluminum tolerance of lotus species. **J Plant Nutr** 13: 729–744. 1990.

BLANCAFLOR, E. B.; JONES, D. L.; GILROY, S. Alterations in the cytoskeleton accompany aluminum-induced growth inhibition and morphological changes in primary roots of maize. **Plant Physiology** 118:159–172. 1998.

BLOOM, P. R.; ERICH, M. S. **The quantitation of aqueous aluminum**. In: SPOSITO, G. (Coord.). *The Environmental chemistry of aluminum*. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 1996. p.1-38.

BOHNEN, H. **Acidez do solo: origem e evolução**. In: KAMINSKI, J. (Coord.). *Uso de corretivos da acidez do solo no plantio direto*. Pelotas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Núcleo Regional Sul, 2000. (Boletim, 4). p.9-19.

BOJÓRQUEZ-QUINTAL, E.; ESCALANTE-MAGAÑA, C.; ECHEVARRÍA-MACHADO, I.; MARTÍNEZ-ESTÉVEZ, M. Aluminum, a friend or foe of higher plants in acid soils. **Front Plant Sci** 8: 1767. 2017.

<https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01767>

BOSCOLO, P. R. S.; MENOSSI, M.; JORGE, R. A. Aluminum-induced oxidative stress in maize. **Phytochemistry** 6: 181–189. 2003.

CARRILLO, N.; VALLE, E.M. El lado oscuro de loxígeno. **Revista de la Sociedad Argentina de Fisiología Vegetal**. Cordoba. v. 2, n. 2. Mar. 2005.

CONAB. (Companhia Nacional de Abastecimento). **Acompanhamento da safra brasileira**. v. 7-Safra 2019-2020 –N. 10. Décimo levantamento/2020. Disponível também em: <<https://www.conab.gov.br/>>.

DELHAIZE, E.; RYAN, P.R. Aluminum toxicity and tolerance in plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 107, n. 2, p. 315-321, 1995.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Sócioeconomia: dados conjunturais do Brasil. Dados conjunturais do Brasil. 2020.**

Disponível em: <http://www.cnpaf.embrapa.br/socioeconomia/index.htm>. Acesso em: 20 jan. 2022.

EPSTEIN, E.; BLOOM, A. J. **Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas.** Planta Editora. 2 ed. 403 p. 2006.

FAO - Food and Agriculture Organizations of the United Nations. (2020, april 30). **FAOSTAT.** Retrieved in 2020, July 29, from <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>

FAO, Food And Agriculture Organizations Of The United Nations. **International year of pulses: Nutritious seeds for a sustainable future.** 2016. Disponível em: <https://www.fao.org/pulses-2016/news/news-detail/en/c/337107/>. Acesso em: 20 jan. 2022.

FARIS, D. G. The origin and evolution of the cultivated forms of *Vigna sinensis*. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, Ottawa, v. 7, n. 6, p. 433- 452. 1965.

FREIRE FILHO, F. R. **Feijão-caupi no Brasil: Produção, melhoramento genético, avanços e desafios.** 1. ed. Teresina, PI: EMBRAPA MEIO-NORTE, 2011. 84 p.

FREIRE FILHO, F. R. **Origem, evolução e domesticação do caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)** In: ARAÚJO, J. P. P. WATT, E. E. (Org). O Caupi no Brasil. Goiânia: EMBRAPA-CNPAF/Ibadan: IITA, 1988. p. 25-46.

FREITAS, F. A.; KOPP M. M.; SOUSA, R. O.; ZIMMER, P. D.; CARVALHO, F. I. F.; OLIVEIRA, A. C. Absorção de P, Mg, Ca e K e tolerância de genótipos de arroz submetidos a estresse por alumínio em sistemas hidropônicos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 1, p. 72-79, 2006. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782006000100011>

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry** 48: 909-930. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>

GULL, M.; SOFI, P. A.; ARA, A. Physiological and biochemical response of cowpea (*Vigna unguiculata* L.) landraces of Kashmir valley under water stress. **Electronic Journal of Plant Breeding**, v. 10, n. 4, p. 1461-147, 2019. <https://www.ejplantbreeding.org/index.php/EJPB/article/view/3226>

GUO, T. R.; ZHANG, G. P.; ZHOU, M. X.; WU, F. B.; CHEN, J. X. Influence of aluminium and cadmium stresses on mineral nutrition and root exudates in two barley cultivars. **Pedosphere** 17:505–512. 2007. [http://dx.doi:10.1016/S1002-0160\(07\)60060-5](http://dx.doi:10.1016/S1002-0160(07)60060-5)

GUPTA, N.; GAURAV, S. S.; KUMAR A. Molecular basis of aluminium toxicity in plants: a Review. **J. Plant Science** 4:21–37. 2013.

HARTWIG, I.; OLIVEIRA, A. C.; CARVALHO, F. I. F.; BERTAN, I.; SILVA, J. A. G.; SCHMIDT, D. A. M.; VALÉRIO, I. P.; MAIA, L. C.; FONSECA, D. A. R.; REIS, C. E. S. Mecanismos associados à tolerância ao alumínio em plantas. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina-PR, v. 28, n. 2, p. 219-228, 2007.

HUANG, D.; GONG, Z.; CHEN, X.; WANG, H.; TAN, R.; MAO, Y. Transcriptomic responses to aluminum stress in tea plant leaves. **Scientific reports**, 11(1), 5800. 2021. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85393-1>

ÍLLES, P.; SCHLICHT, M.; PAVLOVKIN, J.; LICHTSCHEIDL, I.; BALUŠKA, F.; OVECKA, M. Aluminium toxicity in plants: internalization of aluminium into cells of the transition zone in Arabidopsis root apices related to changes in plasma membrane potential, endosomal behaviour, and nitric oxide production. **Journal of Experimental Botany** 57:4201–4213. 2006.

JACYN BAKER, C.; MOCK, N. M. An improved method for monitoring cell death in cell suspension and leaf disc assays using evans blue. **Plant Cell Tiss Organ Cult** 39, 7–12 1994. <https://doi.org/10.1007/BF00037585>

JONES, D.; KOCHIAN, L. Aluminum inhibition of the inositol 1,4,5-triphosphate signal transduction pathway in wheat roots; a role in aluminum toxicity? **Plant & Cell Physiology** 7: 1913–1922. 1995.

KAR, D.; PRADHAN, A. A.; DATTA, S. The role of solute transporters in aluminum toxicity and tolerance. **Physiologia Plantarum**, 171(4), 638–652. 2021. <http://dx.doi.org/10.1111/ppl.13214>

KIRIGIA, D. et al. Development stage, storage temperature and storage duration influence phytonutrient content in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). **Heliyon**, v. 4, n. 6, p. e00656, 2018.

KOCHIAN L.V.; HOEKENGA, O. A.; PIÑEROS, M. A. How do crop plants tolerate acid soils Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency? **Annual Review of Plant Biology**. V. 55, p. 459-493, 2004. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141655>

KOCHIAN, L. V.; PIÑEROS, M. A.; HOEKENGA, O. A. The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminium resistance and toxicity. **Plant and Soil** 274: 175– 195. 2005.

KOPITTKE, P. M.; BLAMEY, F. P. C.; MENZIES, N. W. Toxicities of soluble Al, Cu, and La include ruptures to rhizodermal and root cortical cells of cowpea. **Plant and Soil** 303: 217–227. 2008.

LIU K, LUAN S. Internal aluminum block of plant inward K⁺ channels. **Plant Cell** 13: 1453–1465. 2001.

MA, J. F.; CHEN, Z. C.; SHEN, R. F. Molecular mechanisms of Al tolerance in gramineous plants. **Plant Soil** 381, 1–12. 2014.

MEENA, H. K.; RAM-KRISHNA, K.; SINGH, B. Character associations between seed yield and its components traits in cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. **Indian Journal of Agricultural Research**, v.49, n.6, p. 567-570, 2015.

NASCIMENTO, S. P.; Nascimento, S. P.; BASTOS, E. A.; ARAÚJO, E. C. E.; FREIRE FILHO, F. R.; SILVA, E. M. Tolerância ao déficit hídrico em genótipos de feijão-caupi. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 15, n. 8, p. 853-860, 2011. <https://doi.org/10.1590/S1415-43662011000800013>

NOCTOR, G.; FOYER, C. H. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** 49: 249-279. 1998. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.49.1.249>

PANDEY, P.; DUBEY, R.S. **Aluminum Uptake, Callose Accumulation, and Invertase Activity in Lowland and Upland Rice Genotypes in Relation to Aluminum Stress Tolerance**. In: Kumar, A., Kumar, P., Singh, S.S., Trisasongko, B.H., Rani, M. (eds) *Agriculture, Livestock Production and Aquaculture*. Springer, Cham. 2022. https://doi.org/10.1007/978-3-030-93258-9_4

PASSOS; A. R.; SILVA; S. A.; HARTWIG, I.; HAWERROTH, M. C.; SANTOS; K. S.; SOUZA, C. M. M. Avaliação de cultivares de mamoneira para tolerância ao alumínio tóxico e insensibilidade ao ácido giberélico. **Magistra**, Cruz das Almas – BA, v. 27, n.1, p. 73 - 81, Jan./Mar. 2015.

POLLE, E.; KONZAK, C.F.; KITTRICK, J. A. Visual detection of aluminum tolerance levels in wheat by hematoxylin staining of seedling roots. **Crop Science**, v.18, p.823-827, 1978.

RENGEL, Z.; ZHANG, W-H. Role of dynamics of intracellular calcium in aluminium-toxicity syndrome. **New Phytol** 159: 295–314. 2003.

ROCHA, M. M.; CARVALHO, K. J. M.; FILHO, R. F. L.; LOPES, A. C. A.; GOMES, R. L. F.; SOUSA, I S. Controle genético do comprimento do pedúnculo em feijão-caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 3, p. 270-275, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2009000300008>

RODRIGUES, L.A.; PRIETO MARTINEZ, H. E.; NEVES, J. C. L.; NOVAIS, R. F.; MENDONÇA, S. M. Respostas Nutricionais de Cafeeiro Catuaí e Icatu a Doses de Calcário em Subsuperfície. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 30:985-995, 2006. <https://doi.org/10.1590/S0100-06832006000600008>

ROSSIELLO, R.O.P.; JACOB NETTO, J. **Toxidez de alumínio em plantas: novos enfoques para um velho problema**. In: Fernandes, M.S. (Ed.). *Nutrição Mineral de Plantas*. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. p.375-418.

RYAN, P. R.; KOCHIAN, L. V. The interaction between aluminum toxicity and calcium uptake at the root apex in near-isogenic lines of wheat (*Triticum aestivum* L.) differing in aluminum tolerance. **Plant Physiology** 102:975–982. 1993.

SANTOS, M. P. A.; SANTOS, A. C.; CHAN, G. A. H.; DALCIN, M. S.; ROCHA, W. S.; LEITE, O. C. Variabilidade espacial de características morfofisiológicas do feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L.). **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, 9(4), 369-376. 2021.

<https://doi.org/10.20873/jbb.uft.cemaf.v9n4.santos>

SARIAH, J. E. **Enhancing cowpea (*Vigna unguiculata* L.) production through insect pest resistant line in East Africa**. PhD thesis - Faculty of Life Sciences, University of Copenhagen, Frederiksberg. 2010. 84p.

SHOMER, I.; NOVACKY, A. J.; PIKE, S. M.; YERMIYAHU, U.; KINRAIDE, T. B. Electrical potentials of plant cell walls in response to the ionic environment. **Plant Physiology**, 133: 411-422. 2003.

SILVA, S. M. S.; MAIA, J. M.; ARAÚJO, Z. B.; FILHO, F. R. F. **Composição química de 45 genótipos de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp).**

Teresina-PI: EMBRAPA, (Comunicado Técnico, 149). 2p. 2002.

SIVAGURU, M.; BALUŠKA, F.; VOLKMANN, D.; FELLE, H. H.; HORST, W. J. Impacts of aluminum on the cytoskeleton of the maize root apex. Short-term effects on the distal part of the transition zone. **Plant Physiology** 119 (3):1073–1082. 1999.

SUMMERFIELD, R. J.; HUXLEY, P. A.; STEEL, W. Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). **Field Crop Abstracts**, Wallingford, v. 27, p. 301-312. 1974.

SUN, L.; ZHANG, M.; LIU, X.; MAO, Q.; SHI, C.; KOCHIAN, L. V.; LIAO, H. Aluminium is essential for root growth and development of tea plants (*Camellia sinensis*). **J Integr Plant Biol** 62: 984–997. 2020.

TAMÁS, L.; BUDÍKOVÁ, S.; HUTTOVÁ, J.; MISTRÍK, I.; ŠIMONOVICOVÁ, M.; ŠIROKÁ, B. Aluminum-induced cell death of barley-root border cells is correlated with peroxidase-and oxalate oxidase-mediated hydrogen peroxide production. **Plant cell reports** 24 (3):189–194. 2005.

<https://doi.org/10.1007/s00299-005-0939-7>

TAYLOR, G. J. **The physiology of aluminum phytotoxicity**. In: Metal Ions in Biological System. Aluminum and Its Role in Biology, Edited by Sigel, H. and Sigel, A. New York: Marcel Dekker. 1988 p.123–163.

TAYLOR, G. J. The physiology of aluminum tolerance in higher plants. **Communication in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v.19, p.1179-1194, 1988.

TRISASONGKO, B.H., RANI, M. (eds) **Agriculture, Livestock Production and Aquaculture**. Springer, Cham. 2022. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-93258-](https://doi.org/10.1007/978-3-030-93258-9_4)

[9_4](#)

VITORELLO, V. A.; CAPALDI, F. R.; STEFANUTO, V. A. Recent advances in aluminium toxicity and resistance in higher plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, 17: 129-143. 2005.

WRIGHT, R. J. Soil aluminum toxicity and plant growth. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 20, n. 15, p. 1479-1497, 1989.

YAMAMOTO, Y.; KOBAYASHI, Y.; DEVI, S. R.; RIKIISHI, S.; MATSUMOTO, H. Oxidative stress triggered by aluminum in plant roots. **Plant and Soil** 255:239–243. 2003.

YANG, M.; TAN, L.; XU, Y.; ZHAO, Y.; CHENG, F.; YE, S.; JIANG, W. Effect of Low pH and Aluminum Toxicity on the Photosynthetic Characteristics of Different Fast-Growing Eucalyptus Vegetatively Propagated Clones. **PLoS One**. 10(6): e0130963. 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130963>

CAPÍTULO I

AVALIAÇÃO DE MODELOS PREDITIVOS NA SELEÇÃO DE LINHAGENS DE FEIJÃO-CAUPI QUANTO A TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar o teor de proteína e o comportamento das enzimas antioxidantes em feijão-caupi aplicando a modelagem preditiva. O experimento foi conduzido na Universidade Estadual de Feira de Santana, seguindo delineamento inteiramente casualizados (DIC) em esquema fatorial 5x14x4, com cinco doses de alumínio (0, 50, 100, 150 e 200 $\mu\text{M AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), doze linhagens e duas cultivares de feijão-caupi (BRS ITAIM e CB-27) e quatro tempos de exposição ao alumínio (0, 2, 4 e 6 dias após a germinação). Foi realizada a extração do extrato enzimático para determinação do teor de proteína e da atividade específica das enzimas antioxidantes (ascorbato de peroxidase (APx), catalase (CAT), guaiacol (POD) e superóxido dismutase (SOD)). Para teste dos modelos preditivos foi utilizado o Random Forest, Tree, Rede Neural e kNN. Com base nos resultados de algoritmos de classificação para o teste proposto, o modelo Random Forest apresentou a melhor acurácia e precisão para o banco de dados analisado. Utilizando análise de cluster foi possível verificar baixos teores de proteínas tanto para a parte aérea quanto para o sistema radicular, já para as enzimas antioxidantes a maior elevação da atividade enzimática ocorreu no sistema radicular em detrimento da parte aérea. Foi possível verificar grande variabilidade entre as linhagens estudadas. Diante disso, pode-se concluir que o modelo Random Forest apresenta o maior nível de capacidade preditiva.

Palavras-chave: Rede Neural, kNN, Tree, Random Forest, Estresse abiótico.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the protein content and behavior of antioxidant enzymes in cowpeas using predictive modeling. The experiment was conducted at the State University of Feira de Santana, following a completely randomized design (DIC) in a 5x14x4 factorial scheme, with five doses of aluminum (0, 50, 100, 150 and 200 $\mu\text{M AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), twelve strains and two cultivars of cowpea (BRS ITAIM and CB-27) and four times of exposure to aluminum (0, 2, 4 and 6 days after germination). The enzymatic extract was extracted to determine the protein content and the specific activity of the antioxidant enzymes (ascorbate peroxidase (APx), catalase (CAT), guaiacol (POD) and superoxide dismutase (SOD)). Random Forest, Tree, Neural Network and kNN were used to test the predictive models. Based on the results of the classification algorithms for the proposed test, the Random Forest model showed the best accuracy and precision for the database analyzed. Using cluster analysis, it was possible to verify low protein levels for both the aerial part and the root system, while for antioxidant enzymes, the greatest increase in enzyme activity occurred in the root system to the detriment of the aerial part. There was great variability between the strains studied. It can therefore be concluded that the Random Forest model has the highest level of predictive capacity.

Keywords: Rede Neural, kNN, Tree, Random Forest, Abiotic stress.

INTRODUÇÃO

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de feijão-caupi, tendo maior porcentagem de cultivo nas regiões Norte e Nordeste, tornando-se o constituinte básico das classes de menor poder aquisitivo, com isso, o feijão-caupi é uma das fontes alimentares de grande importância para as regiões tropicais e subtropicais do planeta (SANTOS et al., 2014).

Diante da importância dessa cultura para o país, ainda é pouco o conhecimento sobre os mecanismos de toxicidade que o alumínio exerce sobre as plantas, tendo como sintoma mais facilmente reconhecido a redução no comprimento radicular das raízes, o qual é o mais importante sinalizador do estresse para esse íon (FAGERIA; SANTOS, 1988).

Algumas plantas podem apresentar diferentes mecanismos de mitigação a alguns tipos de estresse, pois qualquer substância quando em grandes quantidades como por exemplo o íon alumínio que pode afetar e, até mesmo inibir o metabolismo, crescimento e desenvolvimento de um vegetal. Tripathi et al., (2021), afirmam que as respostas ao crescimento vegetal, desenvolvimento, reprodução e estresse ambiental são estritamente reguladas por uma complexa rede de vias de sinalização, que por consequência podem provocar o estresse oxidativo, oxidando biomoléculas como lipídeos, proteínas, pigmentos e ácidos nucléicos (YOKEL; MCNAMARA, 2001; SILVA et al., 2006).

O estresse biótico ou abiótico aumenta a produção das EROs (espécies reativas de oxigênio) em plantas, provocando assim o estresse oxidativo que consequentemente provoca distúrbios irreversíveis no metabolismo, como ocorrer no caso do alumínio. Quando este está presente na sua forma lábil pode aumentar a produção de EROs levando o vegetal o estresse oxidativo, o qual pode provocar a peroxidação lipídica das membranas e, consequentemente, a presença do acúmulo de malondialdeído (MDA), e pela modulação da atividade de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e guaiacol peroxidase (POD) entre outras (SILVA, 2012; JESUS et al., 2017; SACHDEV et al., 2021; XIAO et al., 2021).

A utilização de modelos de predição para análise de dados se tornou uma ferramenta poderosa inclusive auxiliando na seleção de genótipos tolerantes a algum tipo de estresse. Portanto, a análise preditiva é considerada um conjunto

de técnicas avançadas que com base em extrações feitas numa variedade de dados, a partir do qual é possível realizar previsões sobre determinados eventos futuros ou desconhecidos (FINLAY, 2014).

Os primeiros autores a desenvolverem os conceitos de razões logarítmicas computacionais que possibilitam trabalhar dados utilizando análise multivariada foram Aitchison (1982); Egozcue et al., (2003). Parent e Dafir (1992) afirmaram que as razões logarítmicas são aditivas no espaço euclidiano n-dimensional e endereçam composições como combinações únicas de partes ou entidades ao invés de partes tomadas isoladamente. Quando essa técnica é utilizada num grupo de dados as distancias multivariadas podem ser calculadas com base nas distâncias Euclidianas ou Mahalanobis (PARENT et al., 2013; DE DEUS, 2018).

Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo comparar modelos preditivos para avaliar linhagens de feijão-caupi quanto ao efeito fitotóxico de doses de alumínio em diferentes tempos de exposição ao íon com resposta de enzimas antioxidativas, utilizando algoritmos de aprendizado de máquina.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na Unidade Experimental Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana no Laboratório de Germinação de Sementes e em casa de vegetação, localizado nas coordenadas geográficas de 12° 16'01" W e 38° 58' 01" E, apresentando 257m de altitude.

O material teve origem e foi selecionado no Ensaio Preliminar de Rendimento da Embrapa Meio-Norte (Tabela 1). Foram utilizadas cinco doses de alumínio (0, 50, 100, 150 e 200 μM $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), com três repetições e quatro tempos (0, 2, 4 e 6 dias) após a germinação.

Tabela 1. Relação dos códigos das linhagens de acordo com suas classes.

Nº do Tratamento	Código da linhagem
A/21	MNC06-895-1
B/22	MNC06-895-2
C/23	MNC06-901-14

D/24	MNC06-907-29
E/25	MNC06-907-30
F/26	MNC06-907-35
G/27	MNC06-908-39
H/28	MNC06-909-52
I/29	MNC06-909-54
J/30	MNC06-909-55
L/31	MNC06-909-68
M/32	MNC06-909-76
N/33	BRS ITAIM
O/34	BRS CB-27

Implantação e condução do experimento

As sementes foram tratadas com solução de hipoclorito de sódio 0,5% durante 10 minutos e posteriormente distribuídas sobre uma folha de papel “germitest” cobertas com uma segunda folha e organizadas na forma de rolos, com 50 sementes para cada rolo, umedecidos com uma quantidade de solução contendo as concentrações de alumínio, equivalente a 2,5 vezes a massa seca do papel. Os rolos foram acondicionados em sacos plásticos transparentes e mantidos em câmara de germinação tipo B.O.D. (Biochemical oxygen demand), regulada para manter temperatura constante de 25 ± 2 °C, com fotoperíodo de 8 horas, tendo a avaliação ao 5º dia segundo critérios estabelecidos nas regras para análise de sementes (BRASIL, 2009). A primeira avaliação ocorreu no 5º e, após 24, 48 e 72 horas em solução contendo doses crescente de alumínio em casa de vegetação, onde as plantas foram cultivadas em vasos de $0,3 \text{ dm}^{-3}$ em solução contendo alumínio nos seus respectivos tratamentos.

Preparação do extrato enzimático

Os extratos enzimáticos brutos foram obtidos para o sistema radicular e para a parte aérea, pela homogeneização de 0,2 g de amostra. As amostras foram maceradas em cadinhos de porcelana com 6,0 mL do tampão de extração, constituído por 100 mM de tampão fosfato (pH 7,0) e 10 mM EDTA dissódico.

Os homogeneizados foram centrifugados a 15000 RPM a 4°C por 15 min e os sobrenadantes coletados e armazenados em ultrafreezer a -80°C, posteriormente foram utilizados para a quantificação da atividade das enzimas antioxidantes e de proteínas.

Quantificação de Proteína

O conteúdo de proteínas dos extratos foi estimado pelo método de Bradford (1976). O corante *Coomassie Brilliant Blue* (BioRad) apresenta uma coloração azulada pela formação do complexo proteína-corante, que reflete a quantidade de proteína presente na amostra. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro no comprimento de onda (λ) de 595 nm e a quantificação foi utilizando como padrão a albumina de soro bovino (BSA) para elaboração da curva (Figura 3).

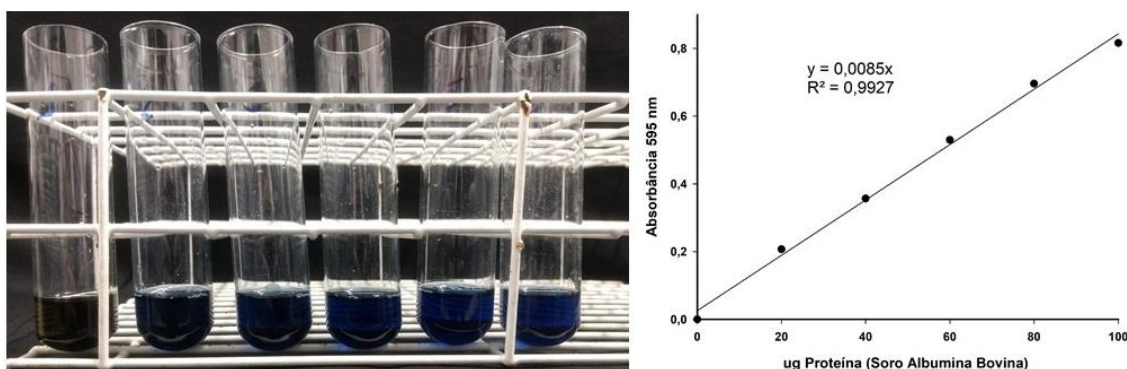


Figura 3. Obtenção da curva padrão de proteínas utilizando-se como padrão Soro Albumina Bovina BSA (1 mg mL⁻¹).

Atividade da Ascorbato Peroxidase (APx, EC 1.11.1.11)

A atividade específica do ascorbato peroxidase (APx) foi realizada pela medição da oxidação do ascorbato dependente de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (Torsethaugen et al., 1997). A mistura de reação foi composta por 100 mM de tampão fosfato (pH 7,0), 10 mM de ácido ascórbico, 2 mM de H₂O₂ e 100 µL de extrato enzimático. A oxidação do ascorbato foi observada pelo decaimento da absorvância a 290 nm, durante 180 segundos de reação com intervalo de leitura a cada 15 segundos. A atividade específica da APx foi calculada utilizando-se o

coeficiente de extinção molar do peróxido de hidrogênio $2,8 \text{ mM cm}^{-1}$ (Nakano; Asada, 1981) e expressa em ($\text{nmol de ascorbato min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína).

Atividade da Catalase (CAT, EC 1.11.1.6)

A atividade específica da catalase (CAT) foi determinada pelo decaimento da absorbância a 240 nm durante 180 segundos com intervalo de leitura de 10 segundos, devido à degradação de H_2O_2 (Havir e McHale, 1987). A mistura de reação foi composta por 100 mM tampão fosfato (pH 7,0), 250 mM de H_2O_2 e 100 μL de extrato enzimático. Os cálculos da atividade foram realizados com base no coeficiente de extinção molar do peróxido de hidrogênio 36 mM cm^{-1} (Boscolo et al., 2003) e expressos em $\text{nmol de H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

Atividade da Guaiacol Peroxidase (POD, E.C.1.11.1.7)

A atividade específica da POD foi determinada por meio do método espectrofotométrico pelo acréscimo na absorbância a 470 nm durante 180 minutos com intervalos de leitura de 15 segundos. A mistura de reação foi composta por 200 mM tampão fosfato (pH 6,5), 100 mM guaiacol, 0,35% de H_2O_2 e 100 μL de extrato enzimático. Os cálculos da atividade foram realizados com base no coeficiente de extinção molar do peróxido de hidrogênio $26,6 \text{ mM cm}^{-1}$. Uma unidade de POD corresponde à quantidade de enzima necessária para produzir 1 nmol min^{-1} de guaiacol oxidado nas condições do ensaio de acordo com Nakano e Asada (1981) com modificações de García-Limones (2002).

Atividade da Superóxido Dismutase (SOD, EC 1.15.1.1)

A atividade específica da superóxido dismutase (SOD) foi realizada foi quantificada em espectrofotômetro a 560nm, pela diferença entre as absorbâncias das amostras iluminadas e não iluminadas de acordo com método descrito por Giannopolitis e Ries (1977). A mistura de reação foi composta por tampão fosfato 100 mM (pH 7,8), 70 mM metionina, 75 μM cloreto de tetrazólio-nitroazul (NBT), 2 μM riboflavina, 0,1 mM EDTA, e 100 μL de extrato enzimático. As cubetas foram agitadas e colocados sob fonte luminosa fluorescente de 40 W

por 20 min. Simultaneamente a esta reação, cubetas contendo toda a solução de reação e amostra foram mantidas no escuro.

Modelagem preditiva

Foram testados quatro modelos: Random Forest, Tree, kNN e Neural Network, utilizando o software Orange Canvas (Figura 4). Foram analisadas 3.066 imagens distribuídas em cinco categorias (doses de alumínio), onde 3035 foram convertidas para um vetor numérico e 31 não foram calculadas durante o processamento das imagens.

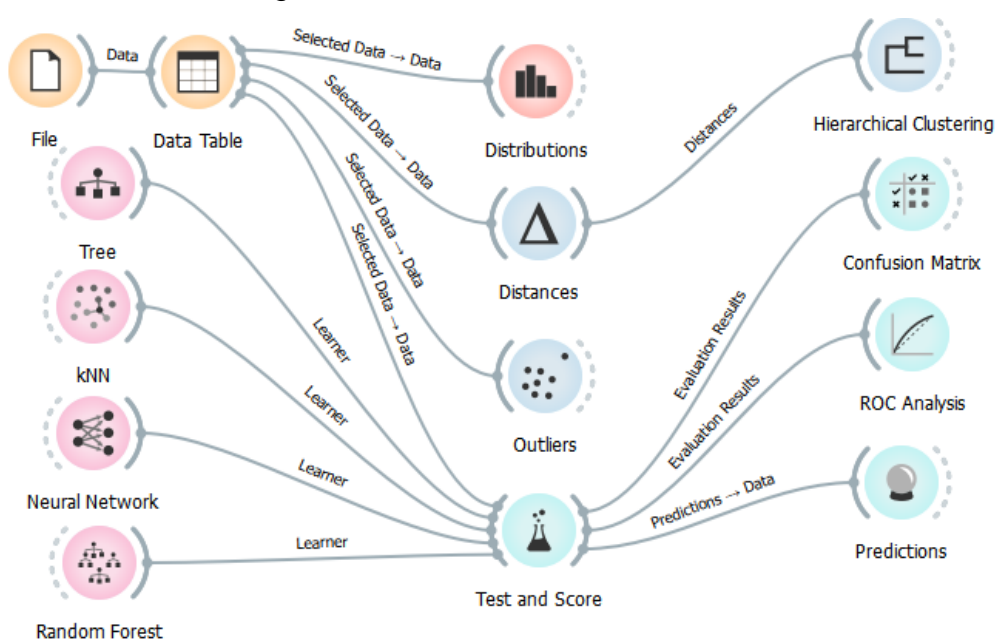


Figura 4. Modelos de validação cruzada utilizados na mineração de dados não supervisionados.

Test and Score (Teste e pontuação)

No teste de pontuação foi utilizado como parâmetro de classificação o desempenho do classificador como precisão de classificação e área sob a curva, em seguida foi utilizado o resultado da avaliação para análise do desempenho dos classificadores, como ROC Analysis e Confusion Matrix. Para isso foi o teste em dados de treinamento onde foi utilizado todo o conjunto de dados para treinamento e, em seguida, para teste.

Random Forest

Foram testados 9 números de árvores de decisão que foram incluídas na floresta, sendo que para cada número de árvores consideradas em cada divisão foram utilizados 11 atributos que foram arbitrariamente desenhados para consideração em cada nó. Foi fixado a geração da árvore o que possibilita a replicabilidade dos resultados, foi selecionado em subconjuntos menores que 5.

Tree

Foi utilizado como número mínimo de instâncias nas folhas 2 exemplos de treinamento para qualquer das ramificações. Para o limite máximo de profundidade da árvore da classificação foi de 100 ao número específico de níveis de nó. O treinamento parou de dividir os nós depois de 95% do limite especificado foi atingido.

kNN

Ao analisar os exemplos de treinamento mais próximos no espaço de recursos e usando sua média como previsão. Foi utilizado como métrica a distância Euclidiana (“linha reta”, distância entre dois pontos). Foi utilizado o peso Uniforme que trata todos os pontos de forma ponderada igualmente.

Rede Neural (Neural Network)

Foram utilizados 152 neurônios por camada oculta, com a função de ativação para a camada oculta de unidade linear retificada (ReLU), para otimização do peso o solucionador foi o Adam (otimizador baseado em gradiente estocástico), o parâmetro de penalidades foi $\alpha=0.0001$, com 200 interações.

Análise de Agrupamento

No agrupamento das linhagens de das doses com os tempos estudados foi aplicada a técnica de análise de agrupamento utilizando o método hierárquico

proposto por Ward (1963), que calcula o aumento da soma dos quadrados do erro.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base nas ferramentas utilizadas nos testes dos algoritmos de aprendizagem, são apresentadas as diferentes medidas de desempenho do classificador como acurácia da classificação e precisão do teste (Tabela 2), para os diferentes modelos preditivos testados.

Quando avaliamos um conjunto de medições a acurácia apresenta um valor específico com base na proximidade das medições, onde os modelos Random Forest e Tree, com 95,7 e 86,4%, respectivamente, o que mostra a robustez destes modelos para lidar com os dados em comparação com outros classificadores.

Segundo Philiips e Dudick, (2008), a acurácia serve como uma importante ferramenta para avaliação do modelo independentemente do limite de corte escolhido. Phillips et al. (2006), ressaltam a capacidade discriminatória do modelo como indicador direto que pode ser interpretada diretamente como a probabilidade do modelo.

Analisando a proporção de verdadeiros positivos entre os dados classificados como positivos, verificamos uma precisão de 0,95 no modelo Random Forest, demonstrando assim uma grande precisão quando analisamos as linhagens de feijão-caupi e as doses de alumínio com o tempo de exposição ao íon.

Tabela 2. Resultados de algoritmos de classificação de teste.

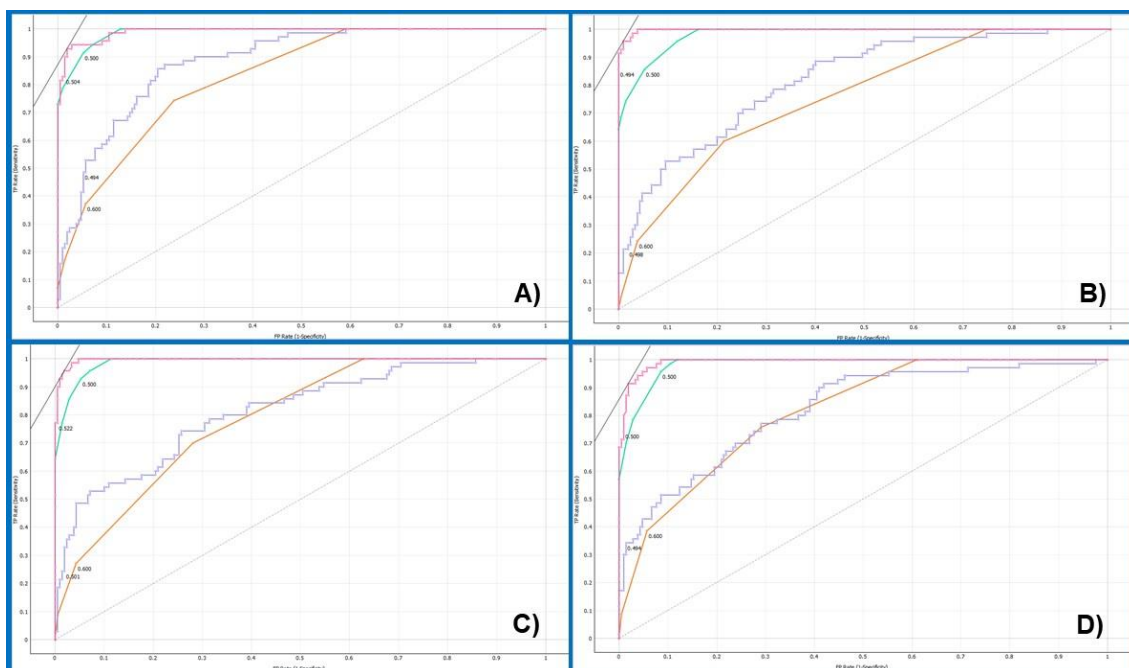
MODELO PREDITIVO	ACURÁCIA %	PRECISÃO
Random Forest	95,7	0,957
Tree	86,4	0,864
kNN	52,5	0,520
Reural Ketwork	56,4	0,560

Com relação a proporção de verdadeiros positivos entre todas as instâncias positivas nos dados analisados o modelo Random Forest foi superior aos demais quando verificamos os resultados encontrados no recall. O mesmo

modelo foi superior aos demais quando comparado a especificidade que é a proporção de verdadeiros negativos entre todas as instâncias negativas.

Para analisar a qualidade das previsões com base no desempenho do classificador utilizando o parâmetro ROC (Característica de Operação do Receptor), foi possível analisar o desempenho da taxa de verdadeiro positivo entre a taxa de falso positivo em vários limites, mostrando assim a relação entre a sensibilidade e especificidade dos modelos testados (Figura 5).

Bradley (1997) afirma que a curva ROC é uma métrica eficaz para avaliar os modelos de aprendizado de máquina. Abbey e Eyo (2021) corroboram afirmando a importância da curva ROC quanto a um modelo de aprendizado de máquina que pode diferenciar adequadamente entre categorias ou classes principalmente quando associado com os resultados encontrados de acurácia. No entanto os mesmos autores ressaltam que através da curva ROC não seria totalmente eficiente para determinar o desempenho dos conjuntos em uma única pontuação de métrica por si só visando uma maior confiabilidade.



A) Tempo de avaliação 0; **B)** Tempo de avaliação 2; **C)** Tempo de avaliação 4; **D)** Tempo de avaliação 6.

Figura 5. Análise da curva característica de operação do receptor para o escore tempo de exposição ao íon alumínio para predição do melhor modelo.

Para os tempos analisados pela curva ROC foi possível observar que os modelos Random Forest seguidos pelo Tree apresentaram o melhor ajuste dentro do banco de dados, quando comparados com o modelo Reural Ketwork

e kNN. Essa constatação foi possível com base na aproximação dos valores com a borda esquerda superior do gráfico ROC, indicando assim alta precisão no teste analisado, Khaidem et al., (2016) afirmam que se estiver próximo da diagonal de 45º graus do espaço ROC significa que o teste não é preciso.

Tripathi et al., (2021) verificaram que o Random Forest multiclasse foi o que apresentou o melhor classificador para dados supervisionados multiclasse quando analisaram peptídeos em plantas.

Quando usamos o valor máximo como métrica de avaliação dos modelos estudados o Random Forest apresentou os maiores valores para todos os tempos estudados, entretanto quando analisamos a confiabilidade do modelo quanto aos dados analisado o modelo Random Forest apresentou em todos os tempos estudados uma maior linearidade no início da curva, indicativo este que confirma a alta precisão do modelo.

Abbey e Eyo (2021), afirmam que a curva de sustentação é uma opção para verificar a sensibilidade na comparação de modelos que confere uma maior credibilidade quanto à eficácia na previsão.

A importância desse recurso está em permitir atribuir pontuações nas variáveis de entrada de um conjunto de dados, confirmando assim a significância relativa ou a utilidade de cada variável para realizar a previsão do modelo de aprendizagem de máquina.

Na figura 6 pode-se visualizar a matriz de confusão para o modelo de classificação de classe para um exemplo de conjunto de dados com o componente tempo de exposição ao alumínio onde o modelo Random Forest apresentou a melhor classificação.

Baryshev et al., (2020), ao realizarem a comparação do método da matriz de confusão com índices básicos de erro, o estudo revelou que diferentes métodos de validação podem às vezes produzir resultados discordantes. Entretanto, no presente estudo a matriz de confusão mostrou que o melhor resultado foi encontrado no modelo Random Forest.

		Predicted				Σ
		0	2	4	6	
Actual	0	65	2	0	3	70
	2	0	69	1	0	70
	4	1	0	66	3	70
	6	3	1	2	64	70
Σ	69	72	69	70	280	

Figura 6. Número de instâncias das instâncias classificadas correta e incorretamente numericamente para o modelo Random Forest.

Ruuska et al., (2018) ressaltam a importância que a matriz de confusão apresenta, pois traz informações sobre a frequência com que um determinado comportamento é detectado de forma correta e com que frequência ele pode ser classificado como tendo outro comportamento.

O dendrograma obtido pela análise de agrupamentos é apresentado na figura 7. Foi possível fazer uma divisão de grupos cada vez que se obteve variação expressiva nos valores de distância euclidiana entre o teor de proteína e a atividade específica das enzimas. Dessa forma, verificou-se a formação de três grupos.

Cada vez que se obtém variação expressiva nos valores de distância euclidiana do teor de proteína e a atividade específica das enzimas, para o conjunto de variáveis consideradas, verificamos a formação de três grupos.

O grupo I ficou caracterizado pelo teor de proteína tanto para o sistema radicular quanto para a parte aérea, o grupo II com uma faixa intermediária com a atividade específica da APx, CAT, POD e SOD na parte aérea, já o grupo III, ficou caracterizado pelo sistema radicular com a atividade específica da APx, CAT, POD e SOD. Nota-se que uma maior atividade específica de todas as enzimas estudadas foi verificada no sistema radicular confirmando assim que a região é a mais afetada, pela maior atividade dessas enzimas na tentativa de minimizar os danos oxidativo ocasionados pelas EROs.

Estudos realizados por Tsukagoshi et al., (2010), constataram que em plantas de *Arabidopsis thaliana* ocorre um maior acúmulo de O_2^{-2} principalmente

na zona meristemática da ponta da raiz, região responsável pela divisão celular, enquanto o H_2O_2 acumula-se na zona de alongamento, que é responsável pela diferenciação celular.

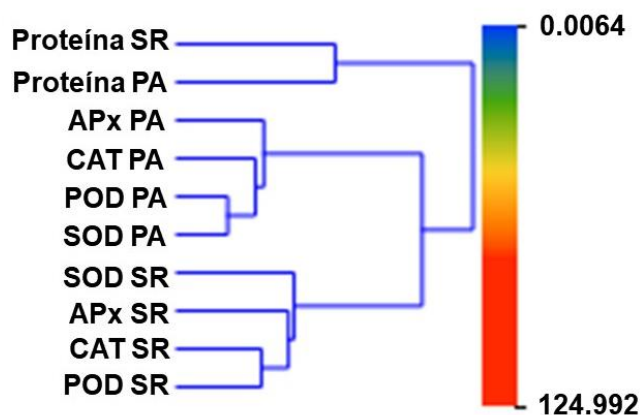


Figura 7. Dendrograma da análise de cluster (Distância Euclidiana) do teor de proteína e a atividade específica das enzimas antioxidantes.

Dunand et al., (2007), estudando a mesma espécie constataram que $O_2^{\cdot-}$ estava predominantemente localizado no apoplasto da zona de alongamento celular, enquanto o H_2O_2 se acumulou na zona de diferenciação e na parede celular dos pelos radiculares em formação. Portanto quando diminuiu a concentração de $O_2^{\cdot-}$ conseqüentemente reduziu o alongamento radicular e a formação de pelos radiculares, enquanto a eliminação de H_2O_2 promoveu o alongamento radicular e suprimiu a formação de pelos radiculares.

Liszky et al., (2004), afirmam que as pontas das raízes são uma zona de produção ativa de EROs. Scheres et al., (2002), ressaltam que a importância da compreensão dessa produção, uma vez que se trata de uma região com células em estados muito diferentes como células meristemáticas e alongadas, e células passando por vários tipos de diferenciação, em uma região que apresenta uma distância muito curta. Esses estudos corroboram com os resultados encontrados quando analisarmos no dendrograma de análise hierárquica (Figura 8), onde fica evidente níveis mais elevados das atividades enzimáticas no sistema radicular nas linhagens, sendo possível a formação de quatro grupos distintos para todos os tempos estudados.

Analisando o tempo 0 (dias), o grupo que apresentou maior atividade das enzimas antioxidantes foi composto pelas linhagens I (sem a presença de alumínio), D na concentração de 50 μM Al, C, L e O na concentração de 200 μM

Al. No tempo 2 (dias) foi mantido o mesmo resultado para as linhagens C, D e O nas mesmas concentrações de Al observadas no tempo anterior.

A linhagem I ficou no grupo com maior atividade enzimática, mais isso se deve a características do próprio genótipo e não pela exposição ao alumínio, pois ao analisar a atividade enzimática das sementes essa linhagem apresentou os maiores valores para APx, POD e SOD, evidenciando assim que esse enquadramento num grupo com maior valor não está diretamente relacionado com a toxidez de alumínio e sim com características do próprio genótipo estudado.

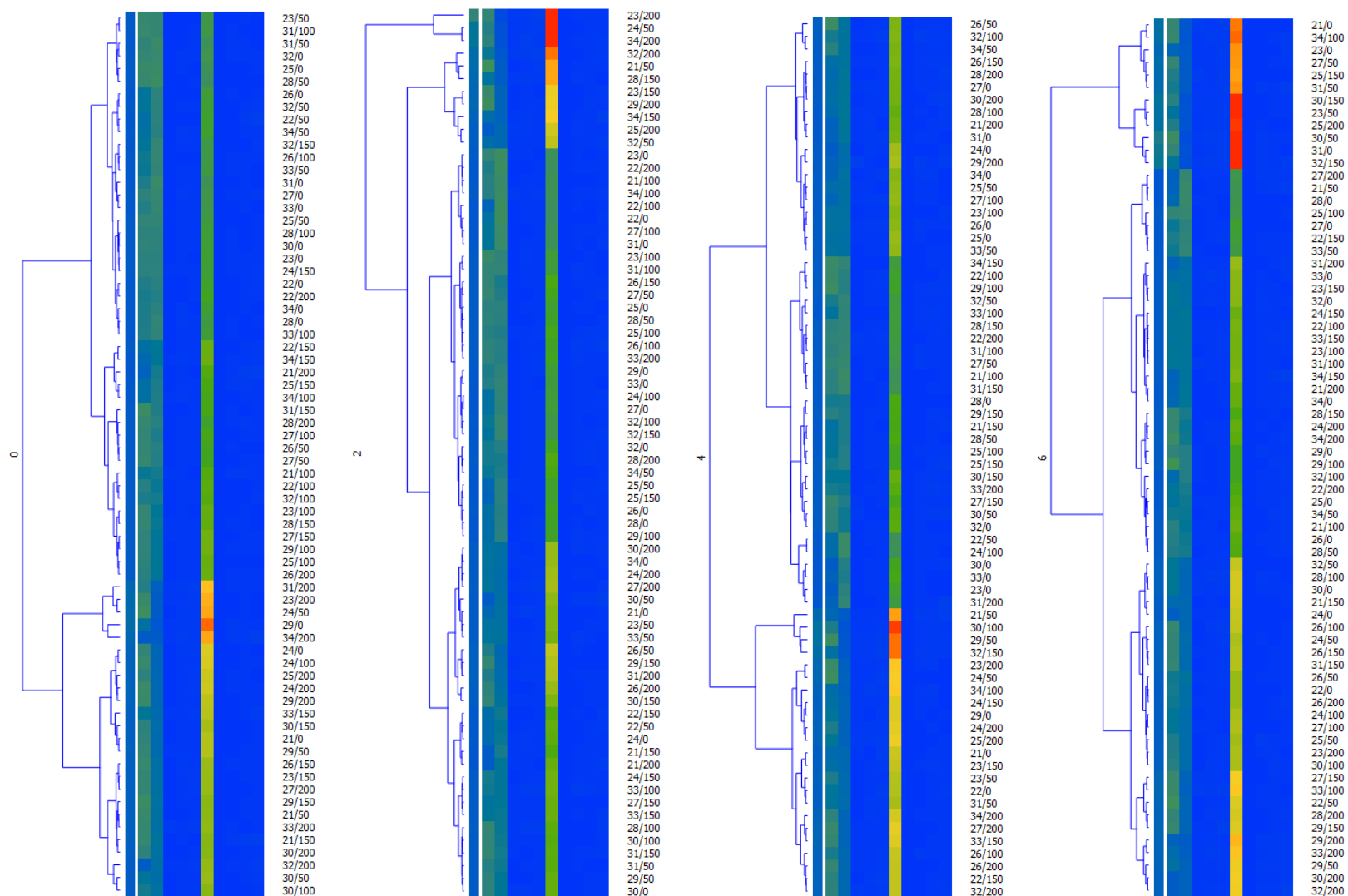


Figura 8. Dendrograma resultante da análise hierárquica de agrupamentos mostrando a formação de grupos segundo o teor de proteína e a atividade específica de enzimas antioxidantes com base nas linhagens e doses de alumínio nos tempos 0, 2, 4 e 6 dias.

Quando analisamos o tempo 4 (dias) ocorreu um aumento de linhagens que não obtiveram resultados expressivos da atividade enzimática em comparação com os tempos anteriores estudados, A e I na concentração de 50 μM Al; J com 100 μM Al e M 150 μM Al.

No tempo 6 (dias) a linhagem L (sem a presença de alumínio), as linhagens C e J com 50 μM Al, a J com 150 μM Al e a linhagem E 200 μM Al, sendo que está linhagem não apresentou atividade enzimática expressiva em nenhum dos tempos anteriores estudados.

CONCLUSÕES

Existe variabilidade quanto a tolerância ao alumínio entre as linhagens de feijão-caupi e ao tempo de exposição ao íon.

Não existe uma relação com o aumento da concentração de alumínio e o tempo de exposição para as linhagens de feijão-caupi.

O modelo que oferece um maior nível de capacidade preditiva é o Random Forest.

A maior atividade enzimática ocorre no sistema radicular.

REFERÊNCIAS

ABBEY, S.; EYO, E. Algoritmos de aprendizado de máquina multiclasse autônomos e conjuntos utilizados para classificar solos com base em suas características físico-químicas. **Journal of Rock Mechanics and Geotechnical Engineering**, 14(2), 2021.

<https://doi.org/10.1016/j.jrmge.2021.08.011>

AITCHISON, J. The Statistical Analysis of Compositional Data; Monographs on Statistics and Applied Probability; **Chapman & Hall Ltd.**: London, UK. v44, 139-160. 1982. <https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1982.tb01195.x>

BARYSHEV, D. D.; BARYSHEVA, N. N.; PRONIN, S. P.; NIKOL'SKII, O. K. Comparison of Machine Learning Methods for Solving the Problem of Wheat Seeds Classification by Yield Properties. **Russian Agricultural Sciences**, 46(4), 410–417. 2020. <https://doi.org/10.3103/s10683674>

BOSCOLO, P. R. S.; MENOSSI, M.; JORGE, R.A. Aluminum-induced oxidative stress in maize. **Phytochemistry** 62: 181-189. 2003.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of rotein-dye binding. **Analytical Biochemistry** 72: 248-254. 1976. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>

BRADLEY. A.P. The use of the area under the ROC curve in the evaluation of machine learning algorithms. **Pattern Recognition**, 30 (7) pp. 1145-1159. 1997.

BRASIL. **Regras para análises de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretária de Defesa Agropecuária -Brasília: MAPA/ACS,2009.

DE DEUS, J. A. L.; NEVES, J. C. L.; M. C. M. C.; PARENT, S. É.; NATALE, W.; PARENT, L. E. Balance design for robust foliar nutrient diagnosis of 'Prata' banana (*Musa* spp.). **Sci. Rep.** 2018, 15040. 2018.

DUNAND, C.; CREVECOEUR, M.; PENEL, C. Distribution of superoxide and hydrogen peroxide in *Arabidopsis* root and their influence on root development: possible interaction with peroxidases. **New Phytol.** 174, 332–341. 2007.
<https://doi/10.1111/j.1469-8137.2007.01995.x>

EGOZCUE, J. J.; PAWLOWSKY-GLAHN, V.; MATEU-FIGUERAS, G.; BARCELÓ-VIDAL, C. Isometric Logratio Transformations for Compositional Data Analysis. **Math. Geol.** 35, 279–300. 2003.

FAGERIA, N. K.; SANTOS, A. B. Rice and common bean growth and nutrient concentration as influenced by aluminum on acid lowland soil. **Journal of Plant nutrition**, v.2, n.5, p.903-12, 1988.

FINLAY, S. Predictive Analytics, **Data Mining and Big Data**. Myths, Misconceptions and Methods (1st ed.). Basingstoke: Palgrave Macmillan. 2014.

GARCÍA-LIMONES, C.; HERVÁS, A.; NAVAS C. J.; JIMÉNEZ-DÍAZ, R.; TENA, M. Induction of an antioxidant enzyme system and other oxidative stress markers associated with compatible and incompatible interactions between chickpea (*Cicer arietinum* L.) and *Fusarium oxysporum* f. sp. ciceris. **Physiological and Molecular Plant Pathology.** 61. 325-337. 2002.
<https://doi.org/10.1006/pmpp.2003.0445>.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide Dismutases: I. Occurrence in Higher Plants. **Plant physiology**, 59(2), 309–314. 1977.
<https://doi:10.1104/pp.59.2.309>

HAVIR, E. A.; McHALE, N. A. Biochemical and Developmental Characterization of Multiple Forms of Catalase in Tobacco Leaves. **Plant Physiology**, 84, 450-455. 1987. <http://dx.doi.org/10.1104/pp.84.2.450>

JESUS, L. R.; BATISTA, B. L.; LOBATO, A. K. S. Silicon reduces aluminum accumulation and mitigates toxic effects in cowpea plants. **Acta Physiologia e Plantarum**, Paragominas, v. 39, n. 6, 138, 14 p, 2017.

<http://dx.doi.org/10.1007/s11738-017-2435-4>

KHAIDEM, L.; SAHA, S.; DEY, S. R. Predicting the direction of stock market prices using random forest. **Applied Mathematical Finance**, 04 2016.

<https://doi.org/10.48550/arXiv.1605.00003>

LISZKAY, A.; VAN DER ZALM, E.; SCHOPFER, P. Production of reactive oxygen intermediates ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , and OH) by maize roots and their role in wall loosening and elongation growth. **Plant Physiology** 136: 1– 10. 2004.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate-specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts, **Plant and Cell Physiology**, v.22, Issue 5, Pages 867–880. 1981.

<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232>

PARENT, L. E.; DAFIR, M. A. Theoretical Concept of Compositional Nutrient Diagnosis. **J. Am. Soc. Hortic. Sci.** 117, 239–242. 1992.

PARENT, S. É.; PARENT, L. E.; ROZANE, D. E.; NATALE, W. Plant Ionome Diagnosis Using Sound Balances: Case Study with Mango (*Mangifera Indica*). **Front. Plant Sci.** 2013.

PHILLIPS, S. J.; ANDERSON, R. P.; SCHAPIRE, R. E. Maximum entropy modeling of species geographic distributions. **Ecological Modelling**, v. 190, p. 231-259, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2005.03.026>

DCUEFS@UEFS.BR

PHILLIPS, S. J.; DUDIK, M. Modeling of species distributions with Maxent: new extensions and a comprehensive evaluation. **Ecography**, v. 31, p. 161-175, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.0906-7590.2008.5203.x>

RUUSKA, S.; HÄMÄLÄINEN, W.; KAJAVA, S.; MUGHAL, M.; MATILAINEN, P.; MONONEN, J. Evaluation of the confusion matrix method in the validation of an automated system for measuring feeding behaviour of cattle. **Behavioural Processes**, 148, 56–62. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2018.01.004>

SACHDEV, S., ANSARI, S. A., ANSARI, M. I., FUJITA, M., HASANUZZAMAN, M. Abiotic Stress and Reactive Oxygen Species: Generation, Signaling, and Defense Mechanisms. **Antioxidants**, v. 10, n. 2, p. 277, 2021. <https://doi.org/10.3390/antiox10020277>

SANTOS, J. A. S.; TEODORO, P. E.; CORREA, A. M.; SOARES, C. M. G.; RIBEIRO, L. P.; ABREU, H. K. A. Desempenho agrônômico e divergência genética entre genótipos de feijão-caupi cultivados no ecótono Cerrado/Pantanal. **Bragantia**, 73, 377-382. 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4499.0250>.

SCHERES, B.; BENFEY, P.; DOLAN, L. Root development. **The Arabidopsis Book** 40: 1–18. 2002. <https://doi.org/10.1199/tab.0101>

SILVA, A. L. S.; SPERLING, P.; HORST, W.; FRANKE, S.; OTT, C.; BECKER, D. A possible role of sphingolipids in the aluminum resistance of yeast and maize. **Journal of Plant Physiology**, v.163, p.26-38, 2006.

SILVA, S. Aluminium Toxicity Targets in Plants. **Journal of botany**, Aveiro, v. 2012, p. 1-8, 2012. <http://dx.doi:10.1155/2012/219462>

TORSETHAUGEN, G.; PITCHER, L. H.; ZILINSKAS, B. A.; PELL, E. J. Overproduction of ascorbate peroxidase in the tobacco chloroplast does not provide protection against ozone. **Plant Physiology** 114: 529–537. 1997.

TRIPATHI, A.; GOSWAMI, T.; TRIVEDI, S. K.; SHARMA, R. D. A multi class random forest (MCRF) model for classification of small plant peptides. **International Journal of Information Management Data Insights**, 1(2), 100029. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ijime.2021.100029>

TSUKAGOSHI, H.; BUSCH, W.; BENFEY, P. N. Transcriptional regulation of ROS controls transition from proliferation to differentiation in the root. **Cell** 143, 606–616. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.10.020>

WARD, J.H. Hierarchical grouping to optimize an objective function. **Journal of the American Statistical Association**, v.58, p.236-244, 1963.

XIAO, Z.; YAN, G.; YE, M.; LIANG, Y. Silicon relieves aluminum-induced inhibition of cell elongation in rice root apex by reducing the deposition of aluminum in the cell wall. **Plant and Soil**, p. 1-17, 2021. <https://doi.org/10.1007/s11104-021-04850>

YOKEL, R. A.; MCNAMARA, P. Aluminium toxicokinetics: an updated minireview. **Pharmacology and Toxicology**, v.88, p.159-167, 2001.

CAPÍTULO II

**MODELAGEM BASEADA EM IMAGEM NA SELEÇÃO DE LINHAGENS DE
FEIJÃO-CAUPI AO ALUMÍNIO**

ABSTRACT

The aim of this study was to compare the performance of machine learning algorithms for predictive analysis and the sites of aluminum ion accumulation, as well as the interaction of the aluminum ion in root morphology during the initial development of cowpea lines. The experiment was conducted at the State University of Feira de Santana, following a completely randomized design (CRD) in a 5x14 factorial scheme, with five aluminum doses (0, 50, 100, 150, and 200 $\mu\text{M AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), twelve lines, and two cowpea varieties (BRS ITAIM and CB-27). Evaluations were performed to identify signs of cell death using the Evans blue dye on root apex samples. In addition to visual evaluation, quantification was performed by spectrophotometer of Evans blue dye absorbed by the roots. For predictive analysis, the models tested were Random Forest, Tree, kNN, and Neural Network. The lines showed differences in aluminum tolerance according to the analyses performed. The highest increases in dye associated with increasing concentration were observed in lines G (MNC06-908-39) and A (MNC06-895-1), 108% and 105%, respectively, and the lowest increases were observed in lines D and C, 71% and 83%, respectively. There is genetic variability among cowpea lines regarding aluminum tolerance, with variety O (CB-27) being the most tolerant and lines I (MNC06-909-54), J (MNC06-909-55), F (MNC06-907-35), G (MNC06-908-39), and M (MNC06-909-76) being more sensitive. According to dye quantification, the lines most tolerant to aluminum were D (MNC06-907-29) and C (MNC06-901-14), and sensitive to Al were lines G (MNC06-908-39) and A (MNC06-895-1), with the quantification method providing a more precise selection than the visual method. The machine learning model with the best predictive ability is the Neural Network.

Keywords: *Vigna unguiculata* L., Evans blue, Abiotic stress, Machine learning.

RESUMO

Objetivou-se neste trabalho comparar a performance de algoritmos de aprendizado de máquina para análise preditiva e os sítios de acúmulo do íon alumínio, bem como a interação do íon alumínio na morfologia radicular no desenvolvimento inicial de linhagens de feijão-caupi. O experimento foi conduzido na Universidade Estadual de Feira de Santana, seguindo delineamento inteiramente casualizados (DIC) em esquema fatorial 5x14, com cinco doses de alumínio (0, 50, 100, 150 e 200 μM $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), doze linhagens e duas variedades de feijão-caupi (BRS ITAIM e CB-27). Foram realizadas avaliações para identificar sinais de morte celular utilizando o corante Evans blue em amostras de ápices radiculares. Além da avaliação visual, realizou-se a quantificação pelo espectrofotômetro do corante Evans blue absorvido pelas raízes. Para análise preditiva foram testados os modelos: Random Forest, Tree, kNN e Neural Network. As linhagens apresentaram diferenças quanto à tolerância ao Al de acordo com as análises realizadas. Os maiores incrementos do corante associado ao aumento da concentração foram observados nas linhagens G(MNC06-908-39) e A(MNC06-895-1), 108 e 105% respectivamente, e os menores incrementos foram observados nas linhagens D e C, 71 e 83% respectivamente. Existe variabilidade genética entre as linhagens de feijão-caupi quanto à tolerância ao alumínio, com a variedade O(CB-27) sendo a mais tolerante e as linhagens I(MNC06-909-54), J(MNC06-909-55), F(MNC06-907-35), G(MNC06-908-39) e M(MNC06-909-76) mais sensíveis. Pela quantificação do corante as linhagens mais tolerantes ao alumínio foram a D(MNC06-907-29) e C(MNC06-901-14) e sensíveis ao Al as linhagens G(MNC06-908-39) e A(MNC06-895-1), com o método da quantificação apresenta uma seleção mais precisa do que o método visual. O modelo de aprendizagem de máquina que apresenta melhor capacidade preditiva é o Neural Network.

Palavras-chave: *Vigna unguiculata* L., Evans blue, Estresse Abiótico, Aprendizado de máquina.

INTRODUÇÃO

O feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], é um componente básico na alimentação de populações rurais e urbanas em todo o mundo, sendo produzido por pequenos e grandes produtores (FAO, 2017). Segundo a CONAB (2022), a produção do Brasil no ano 2021/22 foi de 36,6 mil toneladas, com uma produtividade variando de 0,4 a 1,5 t ha⁻¹. Números considerados inferiores ao real potencial que essa cultura pode proporcionar principalmente quando comparação a países com uma agricultura de alto nível tecnológico como é o caso do Estados Unidos cuja produtividade ultrapassa 1,5 t ha⁻¹ (FAO, 2017; CONAB, 2018).

Um dos fatores associados a baixas produtividades encontradas no Brasil pode estar relacionado a altos níveis de saturação por alumínio no solo, sendo considerado por Eekhout et al., (2017), um limitante à produção agrícola mundial. Kochian et al., (2015), afirmam que esse prejuízo em produtividade é agravado em função dos solos brasileiros serem altamente intemperizados.

Ao ser absorvido pelas plantas o Al tende a acumular-se preferencialmente no ápice radicular promovendo a inibição ao alongamento da raiz e a divisão celular (Kochian et al., 2004). O excesso de Al inibe o crescimento e causa alterações na conformação do sistema radicular, tornando as raízes engrossadas, inchadas, com coloração marrom, menos ramificadas, quebradiças e com pontuações escuras nas extremidades, conferindo assim uma desorganização morfológica dentro do ápice radicular (EPSTEIN; BLOOM, 2006; YANG et al., 2015).

Simonovicova et al., (2004) afirmam que lesões nas membranas celulares ocorre em resposta a algum tipo de estresse biótico ou abiótico, podendo assim, funcionar como um indicador para avaliação de danos celulares ou até mesmo a morte celular.

A perda da integridade da membrana está diretamente relacionada com o processo de morte celular, como consequência ocorre a inibição do alongamento radicular causado pelo estresse, em função do nível de alumínio (PANDA; BALUŠKA 2015). Delisle et al., (2001) utilizaram uma cultivar de trigo tolerante ao alumínio para evidenciar o grau de tolerância à morte das células epidérmicas, sugerindo que em cultivares tolerantes ocorre uma substituição das

células epidérmicas intoxicadas com alumínio enquanto o crescimento do sistema radicular é mantido. Já Kariya et al., (2017) fizeram uma correlação entre a inibição do alongamento radicular com o aumento nas taxas de morte celular em raízes de tabaco expostas ao Al.

A tolerância ao alumínio é uma das características que conferem as plantas adaptação a determinadas condições desfavoráveis para o seu pleno crescimento e desenvolvimento, podendo ter reflexo positivo na produtividade de grãos nos genótipos tolerantes, quando comparados àqueles que não apresentam alguma tolerância.

Entender sobre a forma com que o alumínio influencia na perda da integridade da membrana e morte celular em plântulas, caracteriza-se como uma alternativa interessante dentro dos estudos de melhoramento vegetal, pois a partir dessas informações será possível identificar quais genes participam e são responsáveis por conferir tolerância e conseqüentemente novas cultivares podem ser desenvolvidas e comercializadas.

Sabendo da importância de identificar os distúrbios morfofisiológico, Jacyn Baker e Mock (1994) demonstraram que o corante Evans blue pode ser bastante confiável para determinação microscópica de morte celular, sendo uma metodologia rápida e de fácil reprodução. Uma análise qualitativa (visual) pode apresentar alguns resultados errôneos, diante disso, algumas ferramentas computacionais podem proporcionar um diagnóstico mais exato na busca pelo desenvolvimento de classificadores precisos e que utilizam métodos de aprendizagem de máquinas, capazes de sumarizar funções de regressão ou classificação com base nos dados disponíveis (GUTIERREZ, 2015).

Ao contrário de alguns métodos tradicionais de análises de dados, os métodos de aprendizagem de máquinas podem lidar com relações mais complexas e não lineares entre os preditores, e ainda possuem a capacidade de analisar dados multifacetados e ruidosos (RECKNAGEL, 2001).

Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo comparar a performance de algoritmos de aprendizado de máquina para análise preditiva e os sítios de acúmulo do íon alumínio, bem como a interação do íon alumínio na morfologia radicular no desenvolvimento inicial de linhagens de feijão-caupi.

MATERIAL E MÉTODOS

Experimento

O experimento foi conduzido no Laboratório de Germinação (LAGER) do Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana – UEFS, no período de outubro a novembro de 2019. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizados (DIC) em esquema fatorial 5 X 14, com cinco doses de alumínio (0, 50, 100, 150 e 200 $\mu\text{M AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), doze linhagens e duas variedades de feijão-caupi (BRS ITAIM e CB-27) com dez repetições totalizando 700 unidades experimentais.

As sementes das linhagens de caupi foram provenientes da EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), com doze linhagens (A MNC06-895-1; B MNC06-895-2; C MNC06-901-14; D MNC06-907-29; E MNC06-907-30; F MNC06-907-35; G MNC06-908-39; H MNC06-909-52; I MNC06-909-54; J MNC06-909-55; L MNC06-909-68; M MNC06-909-76; e duas cultivares comerciais N BRS ITAIM; O CB-27). Todas as linhagens são da subclasse comercial FR-Fradinho. As sementes utilizadas no estudo foram da safra 2018, colhida na própria unidade experimental do Horto Florestal, onde estavam armazenadas em embalagens hermeticamente fechadas à temperatura ambiente.

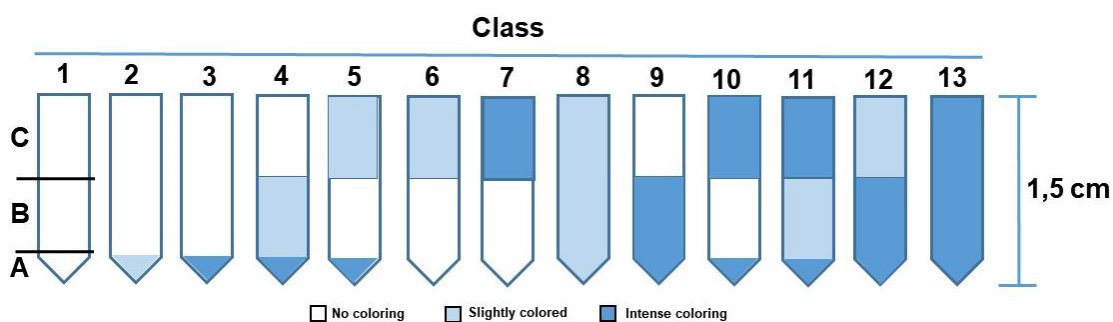
Germinação

As sementes foram tratadas com solução de hipoclorito de sódio 0,5% durante 10 minutos e posteriormente distribuídas sobre uma folha de papel “germitest” cobertas com uma segunda folha e organizadas na forma de rolos, com 50 sementes para cada rolo, umedecidos com uma quantidade de solução contendo as concentrações de alumínio, equivalente a 2,5 vezes a massa seca do papel. Os rolos foram acondicionados em sacos plásticos transparentes e mantidos em câmara de germinação tipo B.O.D., regulada para manter temperatura constante de 25 ± 2 °C, com fotoperíodo de 8 horas, sendo realizada a avaliação ao 5º dia segundo critérios estabelecidos nas regras para análise de sementes (BRASIL, 2009).

Detecção de células em processo de morte celular

Para avaliar a morte celular foi realizado o teste com o corante Evans blue em amostras de ápices radiculares (1,5 cm). Os ápices radiculares foram imersos na solução de Evans blue (0,25%: p/v) por 15 minutos, seguido de lavagem em água destilada (KATO et al., 2007).

As raízes coradas e lavadas foram observadas no microscópio ótico digital modelo BA410E, com câmera acoplada modelo Moticam10 Plus 2.0. As células mortas foram coradas em azul, com variação entre azul claro (menor degradação da membrana celular) e azul escuro (maior degradação da membrana celular) (FAORO; IRITI, 2005), seguindo classificação proposta por Braccini et al., (2000) com algumas modificações (Figura 9).



Fonte: Adaptado Braccini et al., (2000).

Figura 9. Classes de acúmulo de AI em raízes, adaptadas para feijão-caupi, por meio do teste de coloração com Evans blue em ápices radiculares. (A) Coifa; (B) Meristema apical (região de divisão celular) e região de alongamento celular; (C) Região de maturação (região basal).

Na figura 10 são apresentadas as escalas para interpretação da coloração pelo Evans Blue, (A) coifa, (B) região meristemática, localizada logo acima da coifa, região essa que apresenta como característica grande divisão celular, (C) região de alongamento do sistema radicular, formando assim os tecidos primários. Raven et al., (2007), ressaltam que essa faixa de transição entre as regiões das raízes ocorre sempre de forma gradual.

Quantificação de danos à membrana / morte celular usando a técnica de coloração Evans blue

Além da avaliação visual, foi feita a quantificação do corante Evans blue absorvido pelas raízes utilizando 1,5 cm do ápice de 10 raízes para cada tratamento. A extração do corante absorvido pelas células mortas ou danificadas foi realizada adicionando 900 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) por uma hora e a leitura feita em espectrofotômetro FEMTO 800XI com comprimento de onda de 600 nm, de acordo com (Figura 10) (VIJAYARAGHAVAREDDY, 2017).

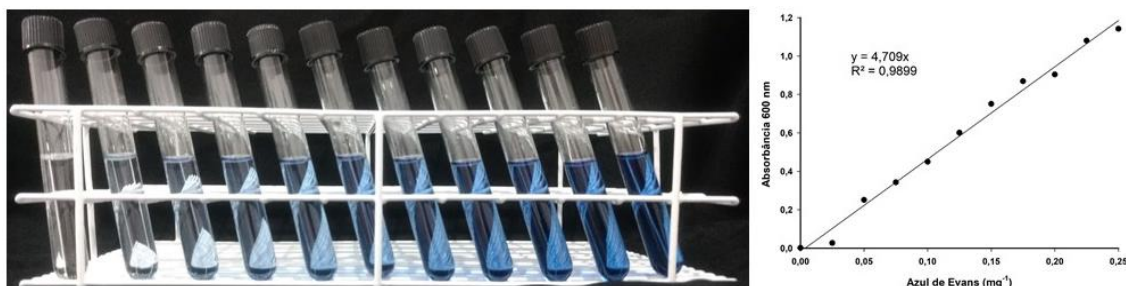


Figura 10. Obtenção da curva padrão com diferentes concentrações do corante Evans Blue.

Modelagem preditiva

Foram testados quatro modelos: Random Forest, Tree, kNN e Neural Network, utilizando o software Orange Canvas (Figura 11). Foram analisadas 3.066 imagens distribuídas em cinco categorias (doses de alumínio), onde 3035 foram convertidas para um vetor numérico e 31 não foram calculadas durante o processamento das imagens.

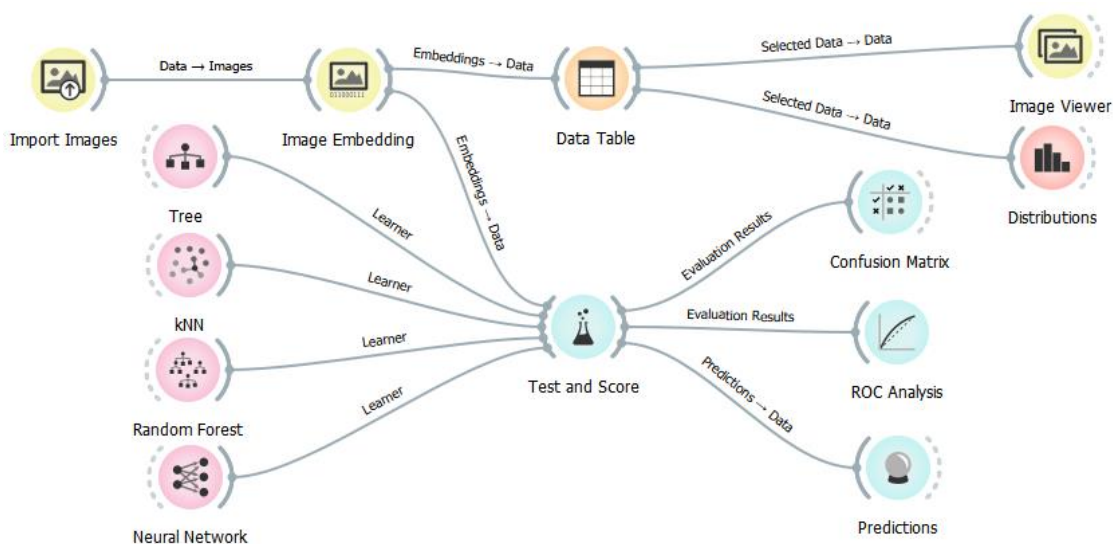


Figura 11. Modelos de validação cruzada utilizados na mineração de dados não supervisionados.

Image Embedding (Incorporação de imagens)

As imagens foram incorporadas utilizando o InceptionV3 que é a rede neural profunda do Google para reconhecimento de imagem, possibilitando assim o treinamento no conjunto de dados ImageNet (SZEGEDY et al., 2016).

Test and Score (Teste e pontuação)

No teste de pontuação foi utilizado como parâmetro de classificação o desempenho do classificador como precisão de classificação e área sob a curva, em seguida foi utilizado o resultado da avaliação para análise do desempenho dos classificadores, como ROC Analysis e Confusion Matrix. Para isso foi utilizada a validação cruzada estratificada com 10 dobras

Random Forest

Foram testados 11 números de árvores de decisão que foram incluídas na floresta, sendo que para cada número de árvores consideradas em cada divisão foram utilizados 5 atributos que foram arbitrariamente desenhados para consideração em cada nó.

Tree

Foi utilizado como número mínimo de instâncias nas folhas 2 exemplos de treinamento para qualquer das ramificações. Para o limite máximo de profundidade da árvore de classificação foi de 100 ao número específico de níveis de nó. O treinamento parou de dividir os nós depois que 95% do limite especificado foi atingido.

kNN

Ao analisar os exemplos de treinamento mais próximos no espaço de recursos e usando sua média como previsão. Foi utilizado como métrica a

distância Euclidiana (“linha reta”, distância entre dois pontos). Foi utilizado o peso Uniforme que trata todos os pontos de forma ponderada igualmente.

Rede Neural (Neural Network)

Foram utilizados 48 neurônios por camada oculta, com a função de ativação para a camada oculta de unidade linear retificada (ReLU), para otimização do peso o solucionador foi o Adam (otimizador baseado em gradiente estocástico), o parâmetro de penalidades foi $\alpha=0.0001$, com 200 interações.

Análise estatística

O modelo estatístico utilizado baseou-se em esquema fatorial utilizando o programa estatístico R (R CORE TEAM, 2018) e os pacotes ExpDes (FERREIRA et al., 2018). Os valores observados das variáveis foram submetidos à análise de variância utilizando o teste F. Os efeitos qualitativos significativos foram comparados por meio do Teste de Scott-Knott e o quantitativo por meio de análise de regressão ambos a ($p \leq 0,05$) de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A evidência de coloração azul nos ápices radiculares com a utilização do corante Evans Blue mostrou que ocorreu morte celular nas raízes das linhagens de feijão (Figura 12).

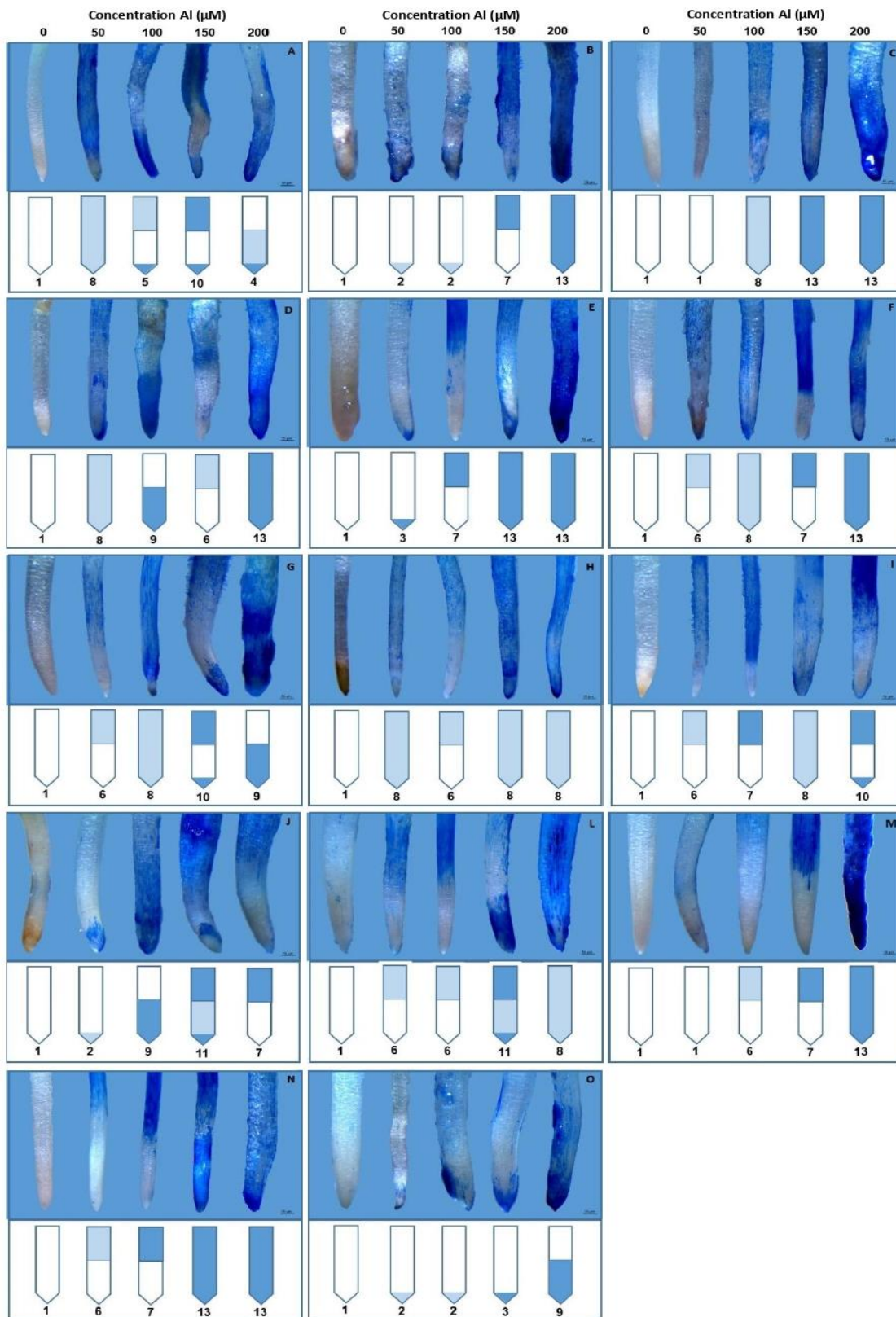


Figura 12. Detecção de morte celular por meio do teste de coloração com Evans Blue em ápices radiculares de linhagens de feijão-caupi após exposição ao alumínio por 5 dias em B.O.D. Todas as imagens foram constituídas por raízes do tratamento controle seguida daquelas submetidas a concentrações crescentes de Al.

Os tratamentos controles não coraram ou em algumas linhagens apresentaram coloração azul muito fraca, indicando uma pequena taxa de morte celular nessas raízes mesmo sem a presença do íon alumínio, isso pode ser explicado por essa parte apresentar intensa divisão celular.

As linhagens A e D (Figura 12) apresentaram uma variação muito grande quanto a alocação do corante nas regiões das raízes entre os tratamentos estudados, com coloração azul claro a partir da concentração 50 μM de Al. Já a linhagem B apresentou coloração azul intenso a partir de 150 μM de Al, o mesmo ocorreu para a linhagem C, sendo que o tratamento com 100 μM de Al apresentou coloração azul claro.

Essas concentrações provocam danos ao DNA, que induzem a parada do ciclo celular, sendo posteriormente expresso com a inibição do crescimento radicular, conseqüentemente comprometendo o metabolismo vegetal (JASKOWIAK et al., 2018). Ryan et al., (1995) afirmam que classes de 9 a 13 apresentam coloração azul intensa pelo grande número de dano físico causado aos tecidos maduros da raiz em decorrência do grande acúmulo de alumínio pela região meristemática, indicando assim que a linhagem em estudo apresenta grande sensibilidade ao íon.

As linhagens I, J, F, G e M, apresentaram coloração azul intensa a partir do tratamento com 150 μM de Al, já a linhagem E e N a partir do tratamento 100 μM de Al. A partir da classe 9, a plântula pode não apresentar mais o mecanismo de liberação de exsudados para complexação do Al extracelular, o que seria uma alternativa para minimizar os danos celulares em linhagens tolerantes (Figura 12).

A linhagem O apresentou coloração azul intenso no tratamento com 200 μM de Al, mostrando-se assim, uma linhagem bastante promissora, pois indica alta tolerância ao íon alumínio. Com a detecção da coloração azul clara para as linhagens H e L, demonstra-se assim que possivelmente o mecanismo de exclusão do Al pode estar presente em linhagens mais tolerantes. Kariya et al., (2017) trabalhando com raízes de tabaco conseguiram estabelecer uma relação entre a redução do alongamento radicular com taxas de morte celular quando as plantas foram expostas ao alumínio.

Com isso entender os mecanismos que podem reduzir os efeitos deletérios do alumínio na ponta da raiz até a zona de diferenciação celular é de

fundamental importância, pois alguns vegetais possuem a capacidade de liberação de exsudados como mecanismo de proteção para mitigar a toxicidade de alumínio no sistema radicular. Sasse et al., (2018) relatam que apesar de ser uma região pequena, esses exsudados apresentam diferentes composições moleculares.

Quando uma linhagem é promissora o íon alumínio não consegue inibir o número e o comprimento das raízes laterais, uma vez que a toxicidade do Al pode ter como principal alvo o DNA, o que foi justificado por Eekhout et al. (2017), ao encontrar mutante de *Arabidopsis* com alta tolerância ao Al.

Kochian et al., (2015) afirmam que plantas que continuam crescendo mesmo sob condição de toxicidade de alumínio possivelmente podem ter acionado o mecanismo de exclusão que está associado à desintoxicação ou até mesmo o aprisionamento de Al absorvido. Esse processo pode ser explicado por Yokosho et al., (2016) que relatam que a relação do grau de tolerância de toxicidade de alumínio em plantas está associada a capacidade que o vegetal tem de sequestrar o íon alumínio e alocar no vacúolo.

Analisando o desdobramento da interação entre linhagens e doses de alumínio foi observado que quando as linhagens foram cultivadas sem a presença do íon alumínio não diferiram estatisticamente entre si (Tabela 3), já nas concentrações de 50, 100, 150 e 200 μM de Al foi possível agrupar as linhagens em 2, 3, 4 e 5 grupos respectivamente. Na concentração 50 μM de Al, as linhagens G e J diferiram estatisticamente das demais por apresentar maior acúmulo do corante, na concentração 100 μM de Al verificou-se que as linhagens as linhagens H, I, J, M e O foram mais sensíveis quando comparado as linhagens B, D, F e N que foram mais tolerantes.

Tabela 3. Desdobramento da interação entre linhagens de feijão-caupi dentro das concentrações de alumínio para o acúmulo do corante Evans Blue no ápice radicular.

LINHAGEM	Concentração de Al (μM)				
	0	50	100	150	200
A	0,000212 a	0,000361 b	0,001444 b	0,002442 c	0,004056 c
B	0,000191 a	0,000934 b	0,000892 c	0,002803 c	0,002761 d
C	0,000042 a	0,001125 b	0,001975 b	0,002378 c	0,002591 d
D	0,000382 a	0,000595 b	0,000998 c	0,001019 d	0,001465 e
E	0,000127 a	0,001041 b	0,001996 b	0,002612 c	0,003122 d
F	0,000021 a	0,000871 b	0,001125 c	0,001550 d	0,004120 c

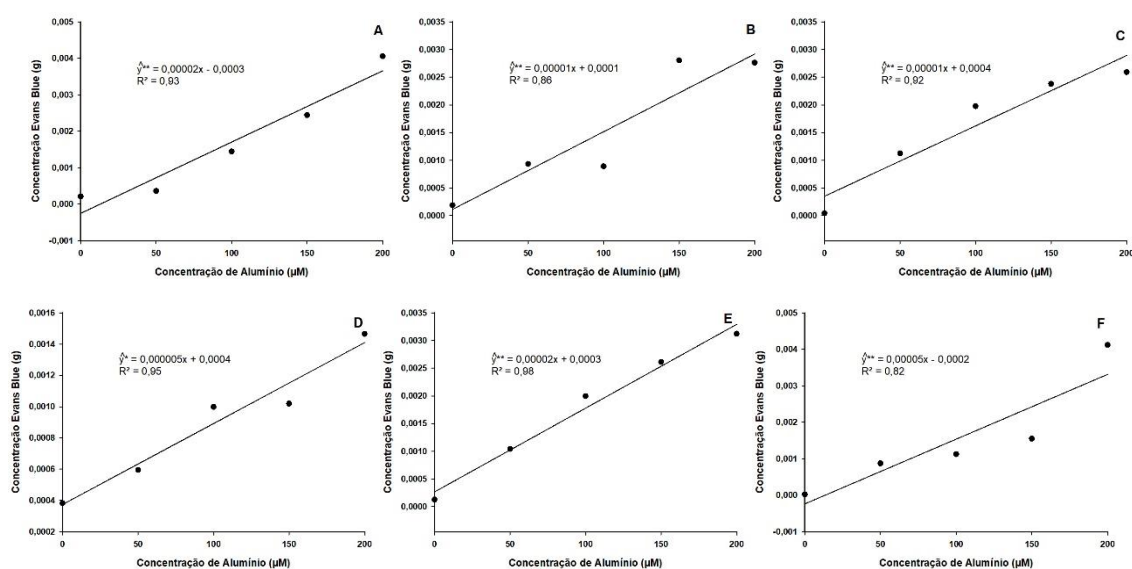
G	0,000191 a	0,002357 a	0,001958 b	0,003037 c	0,010363 a
H	0,000106 a	0,000637 b	0,003058 a	0,003291 c	0,003568 c
I	0,000064 a	0,001083 b	0,002421 a	0,002463 c	0,004438 c
J	0,000106 a	0,002612 a	0,003568 a	0,005458 a	0,006434 b
L	0,000234 a	0,001210 b	0,001593 b	0,003865 b	0,003992 c
M	0,000085 a	0,001444 b	0,002655 a	0,002718 c	0,003355 c
N	0,000340 a	0,000807 b	0,000977 c	0,002039 d	0,003950 c
O	0,000403 a	0,001487 b	0,002548 a	0,005118 a	0,005713 b

Letras diferentes na coluna indicam diferenças significativas pelo teste de Scott Knott ($p \leq 0,05$).

Na concentração 150 μM de Al as linhagens mais tolerantes foram a D, F e N, as linhagens J e O as mais sensíveis, já para a concentração 200 μM de Al a linhagem G diferenciou das demais por apresentar maior acúmulo do corante Evans blue, demonstrando assim mais sensibilidade a toxicidade do alumínio, a mais tolerante foi a linhagem D, que provavelmente de ter algum mecanismo fisiológico como exemplo a emissão de exsudados pelo sistema radicular para mitigar os efeitos deletérios do Al.

Safari et al., (2017) ressaltam que plantas sensíveis ao alumínio aumentam a inibição e o crescimento radicular, sendo que essa redução pode ocorrer em horas ou até mesmo em minutos, mesmo quando o vegetal é exposto à baixas concentrações do íon alumínio, tendo a parede celular como principal alvo.

Ao analisar o desdobramento da interação das doses de alumínio nas linhagens de feijão-caupi (Figura 13), foi observado efeito significativo para todas as linhagens com comportamento linear positivo.



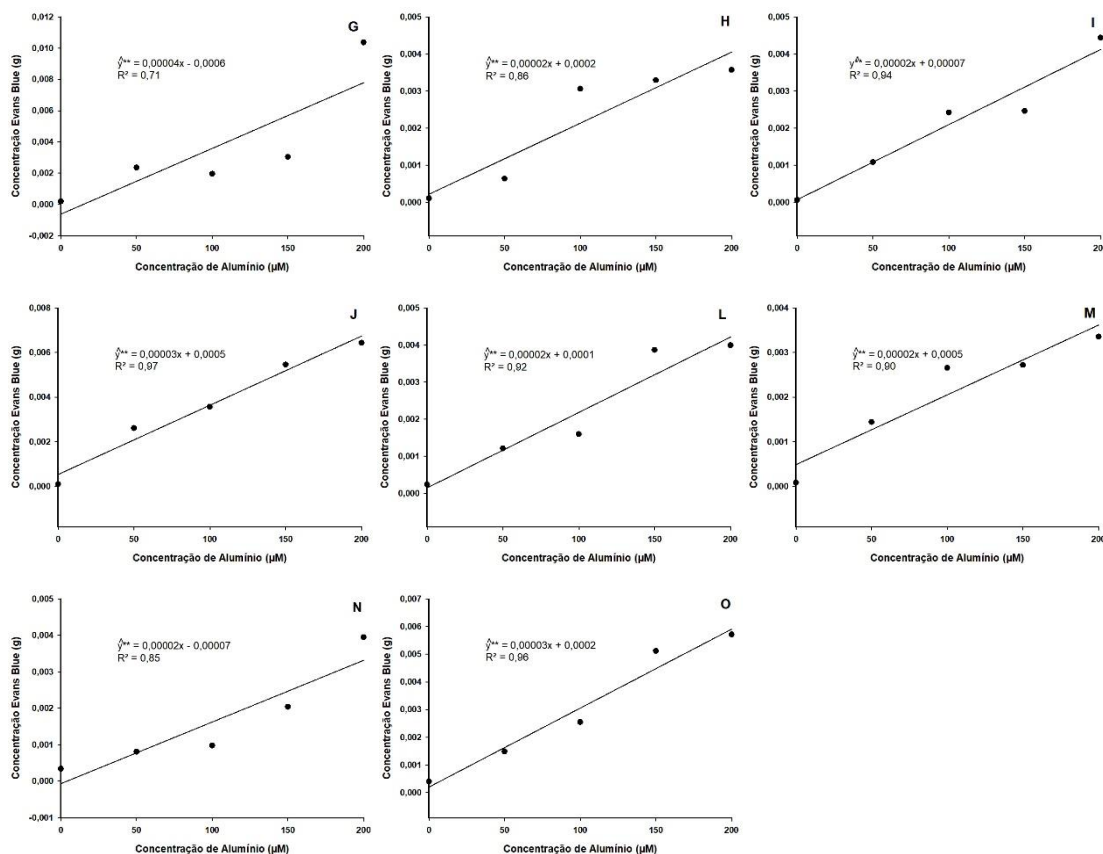


Figura 13. Desdobramento da interação das concentrações de alumínio dentro das linhagens de feijão-caupi para o acúmulo do corante Evans Blue no ápice radicular. Feira de Santana-BA, 2019.

Os maiores incrementos foram observados nas linhagens G>A>F=N>L>O>B=H>E>J>M>I>C>D, com valores percentuais de 108; 105; 102; 102; 98; 97; 95; 95; 93; 92; 89; 85; 83 e 71%, respectivamente quando comparados ao tratamento controle. Evidenciando assim que a linhagem G foi capaz de acumular uma grande quantidade de corante devido à grande área de morte celular e que a linhagem D apresentou o menor incremento de corante com o aumento das concentrações de Al.

Um menor acúmulo do Evans blue pode ser um indicativo de uma linhagem que apresenta mecanismos de mitigação da toxicidade do íon alumínio. Panda e Baluška (2015) relatam que uma maior tolerância ao alumínio pode minimizar a perda da integridade da membrana que está intimamente relacionada com a inibição do alongamento radicular causado pelo íon alumínio, resultando assim em morte celular.

Giannakoula et al., (2010) verificaram acúmulo de alumínio de 1,5 a 3,2 vezes mais em genótipos de milho sensíveis quando comparado aos genótipos tolerantes, ambos após 72 horas de exposição.

Uma vez dentro da planta o alumínio pode se ligar a fosfolipídeos e proteínas presentes nas membranas, alterando dessa maneira sua permeabilidade e dificultando a absorção de água pela planta. Essas alterações já foram demonstradas em diversas espécies tais como: alfafa (*Medicago sativa* L.) Cui et al., (2017), sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) Zhou et al., (2017), centeio (*Secale cereale*) Sousa et al., (2016), e grão-de-bico (*Cicer arietinum*) (SHARMA et al., 2016).

Analisando a proporção de verdadeiros positivos entre os dados classificados como positivos, verificamos uma precisão de 0,724 no modelo Reural Ketwork, apresentando assim uma grande precisão (Tabela 4).

Tabela 4. Resultados de algoritmos de classificação de teste.

MODELO PREDITIVO	ACURÁCIA	PRECISÃO
Random Forest	57,2%	0,570
Tree	53,4%	0,534
kNN	68,8%	0,697
Reural Ketwork	72,4%	0,724

Para as concentrações de alumínio testadas nas linhagens de feijão-caupi analisadas pela curva ROC (Figura 14), foi possível observar que o modelo Reural Ketwork apresenta o melhor ajuste dentro do banco de dados analisados quando comparados com o modelo Random Forest, Tree e kNN. Essa constatação foi possível devido a aproximação dos valores com a borda esquerda superior do gráfico ROC, a qual indica alta precisão no teste analisado, Khaidem et al., (2016) afirmaram que se estiver próximo da diagonal de 45 graus do espaço ROC significa que o teste não é preciso.

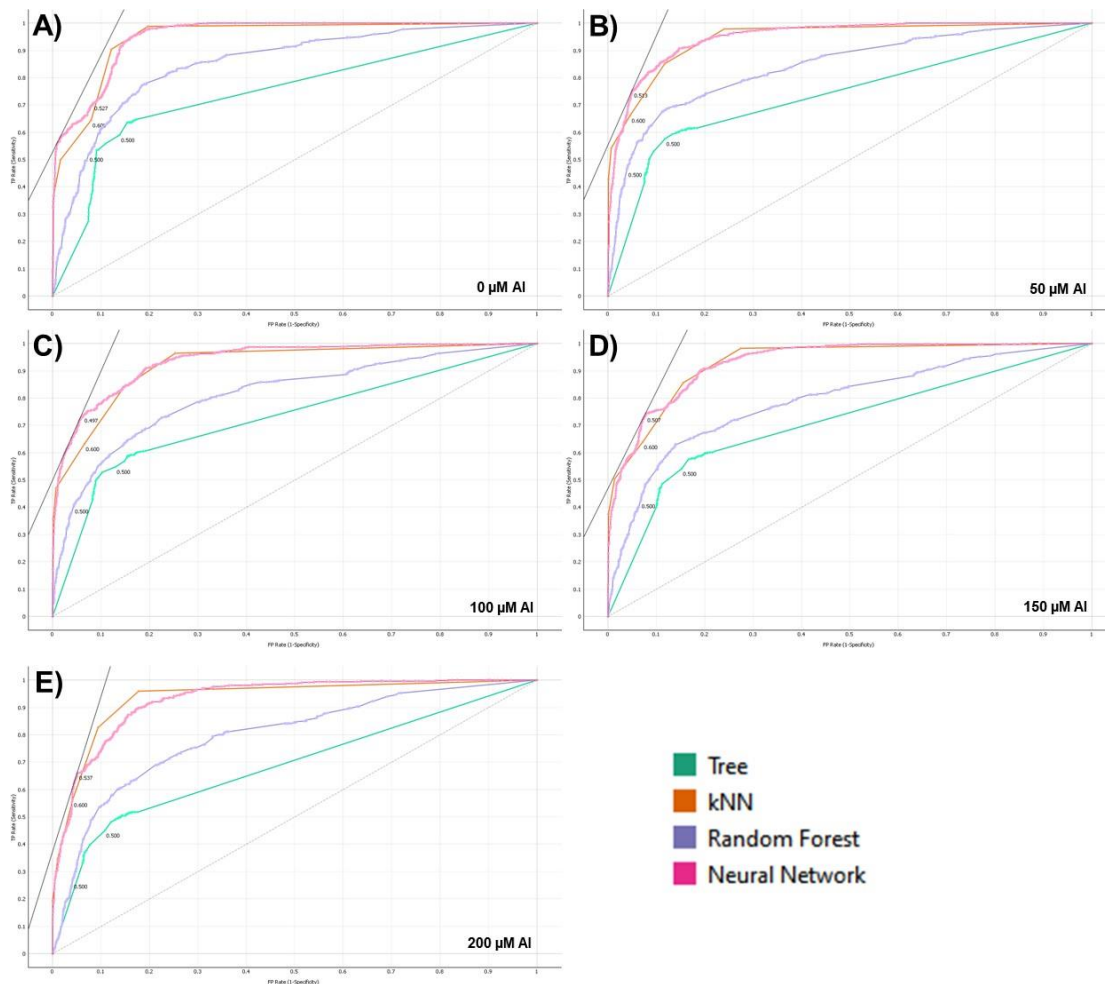


Figura 14. Análise da curva característica de operação do receptor para concentração do íon alumínio.

Na figura 15 é apresentada a matriz de confusão para o modelo Reural Ketwork nas concentraçõess de alumínio estudadas, onde foi observado a frequência com que um determinado comportamento pode ser detectado de forma correta pelo modelo em evidência. Baryshev et al., (2020) ressaltam a importância da avaliação de diversos modelos em um mesmo grupo de dados, pois os memos podem apresentar diferentes resultados.

		Predicted					Σ
		DOSE 0	DOSE 100	DOSE 150	DOSE 200	DOSE 50	
Actual	DOSE 0	472	65	67	15	47	666
	DOSE 100	73	455	27	40	20	615
	DOSE 150	67	21	506	60	28	682
	DOSE 200	16	47	70	303	30	466
	DOSE 50	52	27	33	33	461	606
Σ		680	615	703	451	586	3035

Figura 15. Matriz de confusão com os números de instâncias dos classificadores correta e incorretamente do modelo Neural Network.

Com base na matriz de confusão podemos observar que a dose 150 apresenta maior confiabilidade, seguida da dose 0, 100, 150, entretanto, a dose 200 apresenta a menor confiabilidade, evidenciando assim uma possibilidade de predição de forma incorreta.

CONCLUSÕES

Pelo método visual de morte celular a linhagem O (CB-27) é a mais tolerante e as linhagens I (MNC06-909-54), J (MNC06-909-55), F (MNC06-907-35), G (MNC06-908-39) e M (MNC06-909-76) são mais sensíveis ao alumínio pela coloração com o Evans blue.

Pela quantificação do Evans blue nas linhagens D (MNC06-907-29) e C (MNC06-901-14) de feijão-caupi foram classificadas como mais tolerantes ao Al e sensíveis as linhagens G (MNC06-908-39) e A (MNC06-895-1) as mais sensíveis.

O método da quantificação do corante Evans blue possibilitou uma seleção mais precisa do que o método visual.

O modelo preditivo que melhor se ajusta ao grupo de dados analisado é o Neural Network.

REFERÊNCIAS

BRACCINI, M.C.L.; MARTINEZ, H.E.P.; SILVA, E.A.M.; BRACCINI, A.L.; SCAPIM, C.A. Crescimento da planta e coloração das raízes com hematoxilina como critérios de avaliação de genótipos de café quanto à tolerância à toxidez por alumínio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.24, p.59-68, 2000.

<https://doi.org/10.1590/S0100-06832000000100008>

BRASIL. **Regras para análises de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretária de Defesa Agropecuária - Brasília: MAPA/ACS, 2009.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos: sétimo levantamento: safra 2018/19**. 2018.

Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. Acesso em: 29 set. 2019.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**. v.9 – safra 2021/22, nº 12 – Décimo segundo levantamento. Set. 2022. p. 88.

CUI, W.; CAO, H.; YAO, P.; PAN, J.; GU, Q.; XU, S.; WANG, R.; OUYANG, Z.; WANG, Q.; SHEN, W. Methane enhances aluminum resistance in alfalfa seedlings by reducing aluminum accumulation and reestablishing redox homeostasis.

Biometals 5: 719- 732. 2017. <https://doi.org/10.1007/s10534-017-0040-z>

DELISLE, G.; CHAMPOUX, M.; HOUDE, M. Characterization of Oxalate Oxidase and Cell Death in Al-Sensitive and Tolerant Wheat Roots. **Plant and Cell Physiology**, 42(3), 324–333. 2001. <https://doi:10.1093/pcp/pce041>

EEKHOUT, T.; LARSEN, P.; DE VEYLDER, L. Modification of DNA Checkpoints to Confer Aluminum Tolerance. **Trends in Plant Science**, 22(2), 102–105. 2017.

<https://doi:10.1016/j.tplants.2016.12.003>

EEKHOUT, T.; LARSEN, P.; DE VEYLDER, L. Modification of DNA Checkpoints to Confer Aluminum Tolerance. **Trends in Plant Science**, 22(2), 102–105. 2017.

<https://doi:10.1016/j.tplants.2016.12.003>

EPSTEIN, E.; BLOOM, A. J. **Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas**. Planta Editora. 2 ed. 2006. 403 p.

FAORO F.; IRITI M. Cell death behind invisible symptoms: early diagnosis of ozone injury. **Biologia Plantarum** 49: 585-592. 2005. <https://doi.org/10.1007/s10535-005-0053-2>

FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI, P. P.; NOGUEIRA, D. A. Package 'ExpDes.pt': Experimental Designs. **R package version 1.2.0**. 62p, 2018.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO).

Faostat. 2017. Disponível em:

<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>. Acesso em: 29 set. 2019.

GIANNAKOULA, A.; MOUSTAKAS, M.; SYROS, T.; YUPSANIS, T. Aluminum stress induces up-regulation of an efficient antioxidant system in the Al-tolerant maize line but not in the Al-sensitive line. **Environmental and Experimental Botany**, v.67, p.487-494, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2009.07.010>

GUTIERREZ, D. D. Machine Learning and Data Science: An Introduction to Statistical Learning Method with R. Basking Ridge, NJ: **Technics Publications**. 2015.

JACYN BAKER, C.; MOCK, N. M. An improved method for monitoring cell death in cell suspension and leaf disc assays using evans blue. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 39(1), 7–12. 1994. <https://doi.org/10.1007/bf00037585>

JASKOWIAK, J.; TKACZYK, O.; SLOTA, M.; KWASNIEWSKA, J.; SZAREJKO, I. Analysis of aluminum toxicity in *Hordeum vulgare* roots with an emphasis on DNA integrity and cell cycle. **PLoS One** 13, e0193156. 2018. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193156>

KARIYA, K.; TSUCHIYA, Y.; SASAKI, T.; YAMAMOTO, Y. Aluminium-induced cell death requires upregulation of NtVPE1 gene coding vacuolar processing enzyme in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). **Journal of Inorganic Biochemistry** 181: 152-161. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2017.09.008>

KATO, Y.; MIURA, E.; MATSUSHIMA, R.; SAKAMOTO, W. White leaf sectors in yellow variegated are formed by viable cells with undifferentiated plastids. **Plant Physiology**. 144: 952-960. 2007. <https://doi.org/10.1104/pp.107.099002>

KOCHIAN, L. V.; HOEKENGA, O. A.; PIÑEROS, M. A. How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency.

Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology, Palo Alto, 55:459-493, 2004. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141655>

KOCHIAN, L. V.; PIÑEROS, M. A.; LIU, J.; MAGALHAES, J. V. Plant adaptation to acid soils: the molecular basis for crop aluminum resistance. **Annual Review of Plant Biology**, 66, 571-598. 2015. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043014-114822>

PANDA, S. K.; BALUŠKA, F. **Aluminum Stress Adaptation in Plants. Signaling and Communication in Plants**. Springer (Eds.). 2015. 283p. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-19968-9>

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. VIENNA, AU: R Foundation for Statistical Computing. 2018. 2673p.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. 7. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 830p.

RECKNAGEL, F. Applications of machine learning to ecological modelling. **Ecol. Model** 146, 303–310. 2001. [https://doi.org/10.1016/S0304-3800\(01\)00316-7](https://doi.org/10.1016/S0304-3800(01)00316-7)

RYAN, P.R.; DELHAIZE, E.; RANDALL, P.J. Characterization of Al-stimulated efflux of malate from the apices of Al-tolerant wheat roots. **Planta**, v.196, p.103-110, 1995. <https://doi.org/10.1007/BF00193223>

SAFARI, M.; GHANATI, F.; SAFARNEJAD, M.R.; CHASHMI, N.A. The contribution of cell wall composition in the expansion of *Camellia sinensis* seedlings roots in response to aluminum. **Planta** 247(2): 381-392. 2017. <https://doi.org/10.1007/s00425-017-2792-7>

SASSE, J.; MARTINOIA, E.; NORTHEN, T. Feed your friends: Do plant exudates shape the root microbiome? **Trends Plant Sci** 23:25–41. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.tplansci.2017.09.003>

SHARMA M.; SHARMA V.; TRIPATHI B.N. Rapid activation of catalase followed by citrate efflux effectively improves aluminum tolerance in the roots of chick pea (*Cicer arietinum*). **Protoplasma** 253: 709–718. 2016.

<https://doi.org/10.1007/s00709-015-0913-3>

ŠIMONOVÍČOVÁ, M.; HUTTOVÁ, J.; MISTRÍK, I.; ŠIROKÁ, B.; TAMÁS, L. Root growth inhibition by aluminum is probably caused by cell death due to peroxidase-mediated hydrogen peroxide production. **Protoplasma**, v. 224, p. 91-98, 2004.

<https://doi.org/10.1007/s00709-004-0054-6>

SOUSA A.; ABDELGAWAD H.; HAN A.; TEIXEIRA J.; MATOS M.; FIDALGO F. Oxidative Metabolism of Rye (*Secale cereale* L.) after Short Term Exposure to Aluminum: Uncovering the Glutathione–Ascorbate Redox Network. **Plant Science** 7:685. 2016. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00685>

SZEGEDY, C.; VANHOUCKE, V.; IOFFE, S.; SHLENS, J.; WOJNA, Z. **Rethinking the inception architecture for computer vision**. In: Proceedings of the IEEE conference on computer vision and pattern recognition. 2016. p. 2818-2826.

<https://doi.org/10.48550/arXiv.1512.00567>

VIJAYARAGHAVAREDDY, P.; ADHINARAYANREDDY, V., VEMANNA, R. S., SREEMAN, S.; MAKARLA, U. Quantification of Membrane Damage/Cell Death Using Evan's Blue Staining Technique. **Bio-protocol** 7(16): e2519. 2017.

<https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2519>

YANG, M.; TAN, L.; XU, Y.; ZHAO, Y.; CHENG, F.; YE, S.; JIANG, W. Effect of Low pH and Aluminum Toxicity on the Photosynthetic Characteristics of Different Fast-Growing Eucalyptus Vegetatively Propagated Clones. **PLoS One**. 10(6): e0130963. 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130963>

YOKOSHO, K.; YAMAJI, N.; MITANI-UENO, N.; SHEN, R.F.; MA, J.F. An Aluminum-Inducible IREG Gene is Required for Internal Detoxification of Aluminum in Buckwheat. **Plant Cell Physiol**. 57, 1169–1178. 2016.

<https://doi.org/10.1093/pcp/pcw065>

ZHOU D.; YANG Y.; ZHANG J.; JIANG F.; CRAFT E.; THANNHAUSER T.W.; KOCHIAN L.V.; LIU J. Quantitative iTRAQ Proteomics Revealed Possible Roles for Antioxidant Proteins in Sorghum Aluminum Tolerance. **Plant Science** 7: 2043. 2017. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.02043>

BARYSHEV, D. D.; BARYSHEVA, N. N.; PRONIN, S. P.; NIKOL'SKII, O. K. Comparison of Machine Learning Methods for Solving the Problem of Wheat Seeds Classification by Yield Properties. **Russian Agricultural Sciences**, 46(4), 410–417. 2020. <https://doi.org/10.3103/s10683674>

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A pesquisa revelou uma notável variabilidade nas linhagens de feijão-caupi em relação à tolerância ao alumínio, enquanto o tempo de exposição ao íon não demonstra uma correlação com o aumento da concentração de alumínio nas linhagens estudadas. Dentre os modelos preditivos analisados, o Random Forest destacou-se por sua maior capacidade preditiva, sinalizando sua eficácia na análise da tolerância ao alumínio. A investigação da atividade enzimática evidenciou uma maior ocorrência no sistema radicular, ressaltando a importância desse componente nas respostas das plantas ao estresse de alumínio.

Além disso, os resultados obtidos por meio de métodos de avaliação de morte celular, como a coloração com o Evans blue, proporcionaram uma melhor percepção sobre a sensibilidade do íon alumínio nas diferentes linhagens. A quantificação do Evans blue reforçou essas conclusões, demonstrando a eficácia desse método em comparação com a avaliação visual. Finalmente, o modelo preditivo Neural Network emergiu como mais apropriado para o grupo de dados analisado, apontando para uma compreensão mais abrangente das relações entre as variáveis estudadas. Essas descobertas ressaltam a diversidade genética nas linhagens de feijão-caupi e a relevância de abordagens metodológicas precisas na investigação da tolerância ao alumínio.