

Relacionamento entre tamanho do nódulo e medições convencionais da nodulação

José Valdemir Tenório da Costa¹, Mario de Andrade Lira Junior^{2*}, Rinaldo Luiz Caraciolo Ferreira², Newton Pereira Stamford², Marcela Campanharo¹ e Clayton Albuquerque de Sousa³

¹Programa de Pós-graduação em Agronomia, Ciência do Solo, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil. ²Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av. D. Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, Pernambuco, Brasil. ³Curso de Graduação em Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil. *Autor para correspondência. E-mail: mario.lira@depa.ufrpe.br

RESUMO. Foi testada metodologia que permite o acompanhamento de nódulos individuais de leguminosas ao longo do tempo. Dos sete dias da emergência até a maturidade fisiológica de plantas de caupi, realizaram-se determinações semanais de número, tamanho, matéria seca dos nódulos, área foliar, altura da planta, matéria seca da parte aérea e do sistema radicular e atividade da nitrogenase. Os nódulos foram digitalizados nas resoluções de 100, 200 e 300 pontos por polegada, e o comprimento e diâmetro de cada nódulo foram determinados com paquímetro digital e nas imagens digitais. Obtiveram-se imagens do sistema radicular de todas as plantas semanalmente na resolução de 300 ppp nos lados mais extensos do vaso. As medições destrutivas e não destrutivas de tamanho de nódulos geralmente apresentaram-se similares. Medições não destrutivas de tamanho de nódulos demonstraram-se como preditoras válidas para medidas como matéria seca de nódulos.

Palavras-chave: análise de imagens, rizóbio, fixação biológica de nitrogênio, FBN.

ABSTRACT. Relationship between nodule size and conventional nodulation measurements. A method was tested to allow the study over time of individual legume nodules. From seven days after emergence to full physiological maturity of cowpea plants weekly determinations of nodule number, size and dry matter, leaf area, plant height aerial part and root system dry masses and nitrogenase activity. Nodules were digitized at 100, 200 and 300 dots per inch resolutions, and each nodule length and diameter was measured with a digital pachymeter and on the digital images. Images of the root system of all plants were obtained weekly at 300 dpi on the larger sides of the pots. Destructive and non-destructive nodule size determinations were generally similar. Non-destructive measures of nodule size were valid predictors for measures such as nodule dry matter.

Key words: image analysis, rizobia, biological nitrogen fixation, BNF.

Introdução

A grande importância da fixação biológica do nitrogênio é devida às incontestáveis vantagens econômicas e ecológicas derivadas desse processo, e um pequeno aumento em sua eficiência teria um impacto importante no balanço global de nitrogênio, além de um aumento na eficiência dos sistemas agrícolas (Phillips, 1999; Panziera *et al.*, 2000).

Apesar de plantas dependentes da fixação de nitrogênio serem freqüentemente mais prejudicadas pela acidez do solo e outros efeitos ambientais adversos do que plantas que recebem nitrogênio mineral (Graham, 1992; Munns, 1992; Hungria e Vargas, 2000), os mecanismos causais, de modo

geral, não são bem conhecidos. No entanto, um efeito comum dessas condições é uma redução no tamanho dos nódulos (Hungria e Franco, 1993) e na velocidade de desenvolvimento dos mesmos (Lira Junior e Smith, 2000; Lira Junior *et al.*, 2003; Lira Junior *et al.*, 2005).

A maioria dos estudos conduzidos até o momento baseou-se em métodos que permitem a observação dos nódulos de forma destrutiva, não sendo possível acompanhá-los ao longo do tempo. Deste modo, não era possível observar a formação dos nódulos e o acompanhamento do crescimento dos mesmos durante o ciclo da cultura, exceto pelo uso de diferentes populações de nódulos a cada colheita em que eram avaliadas e comparadas.

Recentemente, trabalhos realizados com ervilha (*Pisum sativum*) e outras espécies de leguminosas descreveram métodos baseados em análise de imagem que permitem medições do tamanho dos nódulos de forma mais acurada e sem a limitação de tempo inerente à determinação convencional (Lira Junior e Smith, 2000; Lira Junior *et al.*, 2003).

Lira Junior *et al.* (2005), por outro lado, utilizaram uma técnica derivada, em que as plantas foram desenvolvidas em hidroponia, com os nódulos visíveis e os mesmos nódulos sendo acompanhados ao longo do tempo. Essa técnica, por sua vez, apresenta as limitações derivadas da hidroponia que, apesar de ser extremamente útil para a investigação de alguns problemas, não é adequada para a análise de diversas condições ambientais, como o complexo acidez do solo, que atuam por mecanismos variados e complexos (Graham, 1992).

Efeitos ambientais nos nódulos, após sua formação, podem também levar à redução no tamanho e número de nódulos (Hungria e Franco, 1993; Delgado *et al.*, 1994; Cordovilla *et al.*, 1996; Arrese-Igor *et al.*, 1999; Silveira *et al.*, 2001).

Deste modo, este trabalho teve por objetivo desenvolver e avaliar um conjunto de técnicas experimentais, baseado no uso de análise de imagens, para permitir o acompanhamento de nódulos de leguminosas, de forma individual, ao longo do tempo.

Material e métodos

Foi conduzido um experimento com caupi cultivar IPA 206 (Miranda *et al.*, 2002) em casa de vegetação da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Estado de Pernambuco. Foram construídos vasos em acrílico transparente medindo 28 cm de altura, 20 cm de largura e 7 cm de profundidade, perfurados no fundo para permitir drenagem e forrados com espuma para evitar perda do substrato de crescimento. Esses vasos foram preenchidos com areia lavada até os 25 cm de altura. Os vasos foram envolvidos com lona plástica dupla face com a finalidade de diminuir a incidência da luz no substrato.

As sementes foram desinfestadas superficialmente (Montealegre *et al.*, 1995) e colocadas para pré-germinar envolvidas em papel toalha umedecido com água destilada por 24 horas. Três sementes por vaso foram semeadas e inoculadas com 1 mL/semente com uma mistura 1:1 (v:v) das estirpes NFB 700 e SEMIA 6156 (Bangel *et al.*, 2001) crescidas em meio YM contendo 10^9 células de rizóbio mL⁻¹. Aos sete dias pós-germinação, foi feito desbaste deixando apenas uma planta por vaso, sendo o substrato em seguida coberto

por espuma para reduzir a evaporação e não permitir perda do substrato durante as operações de obtenção das imagens.

Irrigações com solução nutritiva de Hoagland sem nitrogênio (Hoagland e Arnon, 1950), diluída dez vezes em água corrente, foram realizadas duas vezes ao dia. A partir dos sete dias após a semeadura até os 70 dias após emergência foi retirado um vaso de cada repetição a cada semana para obtenção de número de nódulos, tamanho (comprimento e diâmetro), matéria fresca e seca dos nódulos, área foliar, número de folhas, altura da planta, matéria seca da parte aérea e do sistema radicular. Os nódulos foram separados manualmente do sistema radicular e digitalizados nas resoluções de 100, 200 e 300 pontos por polegada, aproximadamente 39, 79 e 118 pontos por centímetro, 24-bits de cor, sendo as imagens utilizadas para determinação do comprimento e diâmetro de cada nódulo, de acordo com Lira Junior e Smith (2000). Os mesmos nódulos tiveram comprimento e diâmetro determinados através do uso de paquímetro eletrônico digital Starrett®, série 727 com seis polegadas. Os nódulos retirados foram digitalizados em bandeja de vidro de modo a evitar seu esmagamento pela tampa do digitalizador (Lira Junior e Smith, 2000).

Digitalizações *in situ* do sistema radicular de todas as plantas foram realizadas semanalmente na resolução de 300 ppp, 24-bits de cor nos dois lados mais extensos de cada vaso. A Figura 1 exemplifica as imagens obtidas do desenvolvimento do sistema radicular e da nodulação. Os nódulos tiveram comprimento e diâmetro determinados (Lira Junior e Smith, 2000) tanto nos retirados manualmente por colheita quanto naqueles que puderam ser observados nas imagens obtidas pela digitalização dos lados mais extensos do mesmo vaso.

A parte aérea, sistema radicular e nódulos de cada planta foram acondicionados em sacos de papel e levados para secagem em estufa com circulação de ar a 70°C, até matéria seca constante, para obtenção da matéria seca da parte aérea e do sistema radicular (g planta⁻¹).

O experimento foi conduzido no delineamento em blocos casualizados, sendo 10 colheitas e 6 repetições, com um total de 60 vasos. A análise estatística foi conduzida utilizando o "Guided Data Analysis Procedure" do SAS (SAS Institute, 1999) para determinação de eventuais *outliers* e transformações requeridas, seguida por uso do GLM Procedure, também do SAS, e análise e seleção de modelos de regressão entre as variáveis de nodulação por análise de imagem e por análise com paquímetro eletrônico.

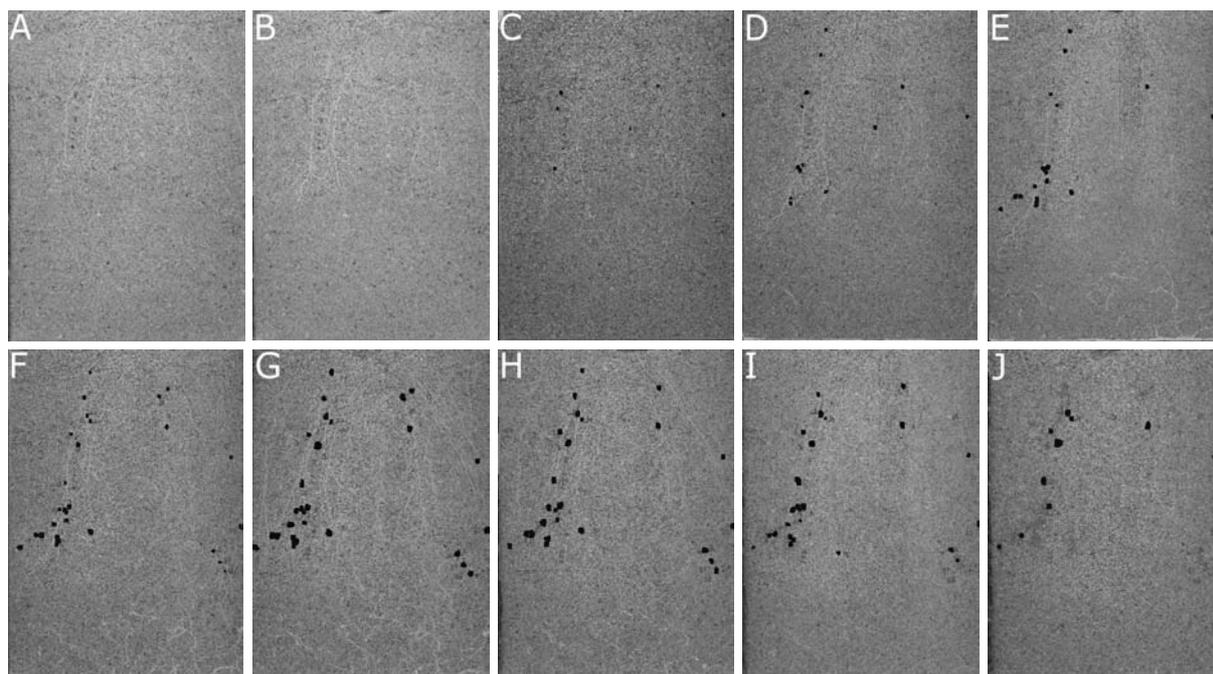


Figura 1. Desenvolvimento do sistema radicular e da nodulação dos 7 aos 70 dias após a emergência. Dias após a emergência (A) 7, (B) 14, (C) 21, (D) 28, (E) 35, F (42), G (49), H (56), I (63), J (70). Pontos em destaque indicam a presença e o tamanho dos nódulos visíveis.

A primeira etapa de análise de dados consistiu na avaliação da adequação do uso de medições por análise de imagem, para determinação de tamanho (comprimento e diâmetro) de nódulos. Foram comparadas as determinações feitas com paquímetro digital em 1196 nódulos de caupi individualmente identificados, com imagens dos mesmos nódulos nas resoluções de 100, 200 e 300 pontos por polegada (ppp) (aproximadamente 39, 79 e 118 pontos por centímetro), utilizando o programa Sigma Scan Pro 5[®], conforme Lira Junior e Smith (2000). Esses dados foram submetidos à análise de regressão, considerando as medições digitais como variáveis independentes e as medições convencionais como dependentes. Foram realizados testes de t para amostras pareadas comparando os valores obtidos para comprimento e diâmetro de nódulos para cada resolução e para determinação através de paquímetro.

Em seguida foram comparados o comprimento e o diâmetro de nódulos determinados no dia da colheita de cada parcela experimental através da medição dos nódulos visíveis na parede externa dos vasos, pela análise de imagem com medições efetuadas nos nódulos separados manualmente. Os dados obtidos para cada nódulo foram utilizados para caracterizar os nódulos pela determinação de Variância, Curtose, 1^o Quartil, Mediana, 3^o Quartil, Normalidade, 95 Percentil, 90 Percentil, 10 Percentil, 5 Percentil, Média, Assimetria e número de

observações de nódulos que foram consideradas como novas variáveis, com um valor por parcela. Esses dados foram utilizados para a realização de testes de t para amostras pareadas para variáveis descritoras dos nódulos observados pelos dois sistemas de análise. Os testes foram conduzidos de forma separada para as plantas a cada idade de colheita.

A terceira etapa de análise consistiu na análise de regressão, coeficiente de variação e nível de significância entre os dados de tamanho de nódulos (comprimento e diâmetro) e dados de desenvolvimento das plantas de caupi que foram: matéria fresca e seca de nódulos, matéria seca da parte aérea e do sistema radicular.

Resultados e discussão

Estimativa do comprimento e diâmetro dos nódulos em função das imagens analisadas nas diferentes resoluções

Para a resolução de 100 ppp, os resultados obtidos apresentaram coeficientes de determinação (R^2) de 0,89 e 0,86 e coeficientes de variação iguais a 15 e 23%, respectivamente, para comprimento e diâmetro dos nódulos. De acordo com Pimentel Gomes e Garcia (2002), esses coeficientes de variação são considerados precisos de modo que os resultados obtidos são fidedignos (Tabela 1). Esses resultados, no entanto, foram os menos favoráveis quando comparados com as demais resoluções estudadas.

Mesmo assim, esses resultados indicam a possibilidade de uso, em especial considerando-se que nesta resolução as imagens são obtidas com maior rapidez do que nas resoluções maiores que também foram estudadas, ocupam menos espaço no disco rígido e podem ser analisadas mais facilmente. Uma desvantagem dessa resolução em relação às demais estudadas é que a menor resolução pode não permitir a identificação de nódulos nas fases iniciais do processo de formação.

Para a resolução de 200 ppp os resultados para comprimento e diâmetro dos nódulos apresentaram-se com coeficientes de determinação (R^2) de 0,91 e 0,88 respectivamente e CV de 14 e 20% (Tabela 1). As imagens obtidas nessa resolução apresentam boa definição, ocupam relativamente pouco espaço, permitem digitalização relativamente rápida e atendem satisfatoriamente às necessidades da pesquisa realizada.

Tabela 1. Equações de regressão comparando comprimento e diâmetro de nódulos através das análises de imagens digitais e medições com paquímetro digital nas resoluções de 100, 200 e 300 pontos por polegada.

Variáveis	Equação	R^2	CV
Comp. na resolução 100	$comp = 0,45 + 0,76(comp100)$	0,89	15%
Comp. na resolução 200	$comp = 0,30 + 0,81(comp200)$	0,91	14%
Comp. na resolução 300	$comp = 0,21 + 0,84(comp300)$	0,92	14%
Diâm. na resolução 100	$diam = -0,39 + 1,32(diam100) - 0,01(diam100)^2$	0,86	23%
Diâm. na resolução 200	$diam = -0,11 + 1,21(diam200) - 0,01(diam200)^2$	0,88	20%
Diâm. na resolução 300	$diam = -0,001 + 1,16(diam300) - 0,07(diam300)^2$	0,89	18%

Comp. = Comprimento; Diâm. = Diâmetro.

Na resolução de 300 ppp, os resultados apresentam coeficiente de determinação (R^2) de 0,92 e 0,89 e CV de 14 e 18% respectivamente para comprimento e diâmetro (Tabela 1). Essa resolução apresenta imagens com definição muito boa, mas apresentam, em relação à resolução intermediária, um tempo maior para obtenção das imagens e tamanho superior dos arquivos. No entanto, é a que apresenta a melhor relação entre as medidas pelo método analógico e pelo método digital, sendo por isso a indicada para novos trabalhos realizados usando esta metodologia de análise de imagens.

Para todas as resoluções, as regressões estudadas indicaram ser viável o uso de métodos de análise de imagem para determinação de comprimento e diâmetro de nódulos separados do sistema radicular, com elevados coeficientes de determinação e com valores de coeficientes de variação entre 14 e 23% para as três resoluções analisadas, indicando que qualquer uma das resoluções pode ser utilizada para

estas determinações.

Foi observada diferença significativa entre as determinações destrutiva e não-destrutiva do tamanho de nódulos, porém com diferença absoluta inferior a um décimo de milímetro. Mesmo apresentando diferença é possível o uso da metodologia não destrutiva para determinação do comprimento e diâmetro de nódulos, visto que as regressões encontradas para as duas metodologias apresentam excelente concordância.

Comparação entre os nódulos visíveis e totais

Na Tabela 2 estão indicadas as probabilidades das diferenças para diversas características dos nódulos visíveis serem diferentes das respectivas características observadas para os nódulos de cada planta a cada data de colheita.

Tabela 2. Níveis de significância para o teste t das amostras pareadas das populações de comprimento e diâmetro de nódulos visíveis determinados através da análise de imagens e medições com paquímetro digital para todos os nódulos da mesma planta.

	Idade das plantas na época da colheita								
	14	21	28	35	42	49	56	63	70
Num Nódulos	<0,0001	0,01	<0,0001	0,02	0,01	<0,0001	<0,0001	0,02	0,09
	Comprimento								
Média	0,32	0,92	0,20	0,32	0,29	<0,0001	0,35	0,52	0,48
Variância	0,08	0,01	0,06	<0,0001	0,02	0,05	0,01	0,07	0,35
Assimetria	0,25	0,06	<0,0001	<0,0001	0,05	0,82	0,47	0,85	0,46
Curtose	0,36	0,45	0,01	0,07	0,10	0,42	0,96	0,97	0,38
1° Quartil	0,67	0,15	0,22	0,04	0,10	0,01	0,01	0,78	0,09
Mediana	0,32	0,15	0,07	0,14	0,24	0,01	0,14	0,65	0,36
3° Quartil	0,19	0,61	0,06	0,48	0,45	0,05	0,96	0,05	0,13
P95	0,21	0,01	0,24	0,27	0,09	0,62	0,21	0,13	0,44
P90	0,26	0,06	0,80	0,65	0,53	0,81	0,50	0,20	0,44
P10	0,86	0,06	0,09	0,06	0,03	0,01	0,05	0,24	0,10
P5	0,68	0,07	0,08	0,17	0,03	0,01	0,02	0,17	0,22
Norm	0,01	0,65	0,07	0,03	0,16	0,53	0,54	0,28	0,56
	Diâmetro								
Média	0,39	0,92	0,21	0,37	0,48	0,01	0,56	0,20	0,97
Variância	0,25	<0,0001	0,68	0,04	0,01	0,06	0,36	0,07	0,23
Assimetria	0,47	0,07	<0,0001	0,03	0,12	0,61	0,26	0,64	0,57
Curtose	0,48	0,79	0,03	0,06	0,26	0,65	0,33	0,94	0,59
1° Quartil	0,80	0,06	0,21	0,06	0,18	0,01	0,04	0,67	0,08
Mediana	0,52	0,11	0,23	0,22	0,30	0,01	0,10	0,19	0,93
3° Quartil	0,39	0,76	0,10	0,65	0,97	0,11	0,96	0,09	0,38
P95	0,15	0,01	0,47	0,50	0,09	0,84	0,41	0,12	0,58
P90	0,15	0,05	0,70	0,98	0,36	0,80	0,70	0,19	0,60
P10	0,97	0,40	0,08	0,15	0,04	0,01	0,03	0,21	0,25
P5	0,60	0,21	0,36	0,18	0,03	0,01	0,03	0,14	0,13
Norm	0,44	0,03	0,47	0,04	0,31	0,39	0,34	0,55	0,35

P 95, 90, 10, 5 = percentis, Norm = normalidade. P 95, 90, 10, 5 = percentiles.

Para as medidas de tendência central (média e mediana), os resultados obtidos pela nova metodologia indicam que ocorreu diferença entre os métodos de determinação na colheita realizada aos 49 dias. As demais colheitas não apresentaram diferença significativa entre os dois métodos, como pode ser observado na Tabela 2. Aos 49 dias, os nódulos já estavam em sua maioria totalmente desenvolvidos e muitos já se encontravam em processo de senescência. Parte dos nódulos de

algumas plantas já não estava mais visível nas paredes dos vasos, o que provavelmente causou a diferença entre os métodos nesta época de colheita para as variáveis analisadas.

Já quanto às medidas de dispersão foram avaliadas variância, assimetria, curtose e normalidade, como pode ser observado na Tabela 2. Para a variância, os resultados indicam que as determinações realizadas nas épocas de colheita referentes aos 21, 35, 42 dias para comprimento e diâmetro e aos 56 dias apenas para o comprimento de nódulos apresentaram diferença significativa entre os métodos utilizados, mas não para as demais épocas de colheita.

Os valores para assimetria revelam que aos 28 e 35 dias, e para curtose aos 28 dias, ocorreu diferença significativa entre os métodos de determinação. Nesta fase os nódulos estavam em processo de desenvolvimento. Possivelmente, em algumas plantas, o tamanho destes nódulos encontrava-se variável, causando essa diferença entre os métodos nestas épocas de colheita.

A normalidade mostra que houve diferença entre os métodos de determinação nas colheitas realizadas aos 14 dias para comprimento e aos 21 dias para diâmetro e na colheita realizada aos 35 dias para comprimento e diâmetro de nódulos, respectivamente. Nas demais colheitas não foram encontradas diferenças significativas para esta variável analisada.

Observando a Tabela 2, os valores encontrados para as medidas de dispersão acima descritas indicam que o método de análise de imagem provavelmente pode ser utilizado mesmo quando algumas épocas de colheita apresentaram diferença significativa entre os dois métodos, visto que não foram encontradas diferenças significativas entre os métodos na fase inicial (aparecimento e formação) e na fase de desenvolvimento e senescência dos nódulos, baseado nos resultados obtidos para estas variáveis analisadas.

Para as medidas separatrizes foram analisados os quartis e percentis. Para o 1º Quartil, os resultados indicam que existe diferença significativa entre os métodos de determinação para o comprimento de nódulos na colheita realizada aos 35 dias e para os comprimentos e diâmetros nas colheitas realizadas aos 49 e 56 dias. Nas demais épocas de colheita não foram encontradas diferenças significativas para esta variável. A diferença foi observada nas épocas de colheita em que os nódulos já estavam em sua maioria totalmente formados com muitos deles já em processo de senescência e decomposição, provavelmente devido à competição por carbono orgânico entre os nódulos e as vagens da planta (Neves e Hungria, 1987), o que

pode ter levado à diferença significativa entre as imagens nestas épocas de colheita. Já para o 3º Quartil não ocorreu diferença significativa entre os dois métodos de determinação para comprimento e diâmetro de nódulos.

Para o Percentil 95 (Tabela 2) houve diferença significativa entre os dois métodos de determinação na colheita realizada aos 21 dias, fase inicial de formação dos nódulos, não ocorrendo diferença para as demais determinações realizadas nas outras épocas de colheita. Para o Percentil 90, não foram encontradas diferenças significativas entre os métodos de determinação durante o ciclo da cultura. Os Percentis 10 e 5 apresentaram resultados que mostram a ocorrência de diferença significativa entre os métodos de determinação para as épocas de colheitas realizadas aos 42 e 49 dias para o comprimento e diâmetro e aos 56 dias, apenas para o diâmetro de nódulos para o percentil 10 e para comprimento e diâmetro no percentil 5. Essa diferença foi encontrada quando os nódulos já estavam formados, com muitos deles em processo de senescência e decomposição, conseqüentemente reduzindo o número visível nas imagens obtidas nesta época, não sendo encontrada diferença para as outras épocas de colheitas realizadas.

No entanto, os resultados encontrados indicam que existe diferença significativa apenas em algumas épocas de colheita para determinadas variáveis, e para outras variáveis não foram encontradas diferenças entre os dois métodos de determinação utilizados nesta pesquisa.

Para o número de observações existe diferença entre os dois métodos de determinação para todas as épocas de colheita, com exceção da realizada aos 70 dias em que não foi encontrada diferença significativa para esta variável, conforme esperado, em função direta da metodologia, que observa e acompanha apenas parte do sistema radicular.

Relacionamento entre medidas de tamanho de nódulos e medidas convencionais de nodulação

Na Tabela 3 pode ser observada a comparação entre comprimento e diâmetro dos nódulos, determinados tanto pela metodologia convencional como através da análise de imagens e matéria fresca e seca de nódulos e matéria seca da parte aérea e do sistema radicular, levando em consideração o número de nódulos. De modo geral, verificou-se que para a metodologia de análise de imagem, os coeficientes de determinação apresentaram-se inferiores aos obtidos com a metodologia convencional, porém com comprimento e diâmetro apresentando geralmente maior importância do que

na medição convencional, como pode ser observado pelos níveis de significância encontrados para cada variável do modelo (Tabela 3).

Esses valores indicam que as determinações das variáveis analisadas podem ser realizadas com qualquer uma das duas metodologias considerando os coeficientes de determinação para as variáveis analisadas nesta seção do trabalho.

Tabela 3. Coeficiente de determinação e nível de significância para média e mediana de comprimento e diâmetro de nódulos, determinados convencionalmente e através da análise de imagens, e número de nódulos como variáveis independentes e matéria fresca e seca de nódulos e matéria seca da parte aérea e do sistema radicular como variáveis dependentes.

	MF nódulos	MS nódulos	MS parte aérea	MS do sistema radicular
Metodologia destrutiva				
Média				
R ²	0,9770	0,9719	0,9527	0,9412
Comp	0,1283	0,2592	0,3391	0,0552
Diam	0,6550	0,6485	0,5731	0,1697
Nº obs	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Mediana				
R ²	0,9462	0,9488	0,9426	0,9363
Comp	0,0266	0,2331	0,4953	0,2028
Diam	0,2587	0,5537	0,8277	0,2101
Nº obs	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Metodologia não-destrutiva				
Média				
R ²	0,8932	0,8867	0,9185	0,9002
Comp	0,0423	0,0465	0,5762	0,3851
Diam	0,0041	0,0047	0,1703	0,1590
Nº obs	0,0093	0,0105	0,0085	0,0077
Mediana				
R ²	0,8327	0,7828	0,9029	0,8499
Comp	0,0104	0,1314	0,0366	0,0544
Diam	0,0003	0,0150	0,0005	0,0056
Nº obs	0,2641	0,1938	0,0726	0,1645

MF = matéria fresca. MS = matéria seca, Comp = Comprimento, Diam = Diâmetro, Nº obs = número de nódulos Transformações utilizadas no método destrutivo para média: matéria seca da parte aérea e do sistema radicular \log_{10} , para mediana: matéria fresca e seca de nódulos potência (0,3), matéria seca da parte aérea e do sistema radicular \log_{10} . Para o método não destrutivo, todas transformadas por \log_{10} . FM = Fresh Mass. DM = Dry matter. Transformations used for destructive method, means: DM Aerial part and root system \log_{10} , for median: Nodule FM and DM power (0,3), Aerial part and root system DM, \log_{10} . For non-destructive method, all transformations were \log_{10} .

Os coeficientes de determinação, apresentados na Tabela 3, estão acima de 0,88. Com relação ao nível de significância, analisando os resultados obtidos pelo uso da metodologia convencional, para matéria fresca e seca de nódulos e matéria seca da parte aérea e do sistema radicular, verifica-se que só ocorreu diferença para o número de observações, não ocorrendo diferença significativa para os demais.

Para as mesmas variáveis, considerando a mediana, foram encontrados maiores coeficientes de determinação para as determinações convencionais em relação às digitais. Destaca-se que, de modo geral, comprimento e diâmetro foram mais significativos considerando a mediana do que a média, indicando que a mediana é mais recomendada como medida de tendência central do que a média, nessas condições.

Na Tabela 3, observam-se os coeficientes de determinação e os níveis de significância que dão uma indicação de que a partir do tamanho dos nódulos (comprimento e diâmetro) pode ser feita uma estimativa do desenvolvimento geral das plantas, com base na metodologia destrutiva (analógica) relacionada com a metodologia não-destrutiva (digital).

Para a matéria fresca de nódulos, observa-se que os coeficientes de determinação obtidos na metodologia analógica da média e mediana foram de 0,98 – 0,95 e 0,89 – 0,83 para as regressões obtidas na metodologia digital, sendo esta um pouco inferior, mas todos altamente significativos para as duas metodologias. O tamanho dos nódulos não apresentou efeito significativo na metodologia analógica na média, com apenas o número de nódulos com nível de significância <0,0001 e na mediana para comprimento e número de observações com níveis de significância de 0,0266 e <0,0001, respectivamente. Já na metodologia digital, foi observado efeito significativo para comprimento, diâmetro e número de nódulos da média com nível de significância 0,0423, 0,0041 e 0,0093, respectivamente, e para comprimento e diâmetro da mediana com nível de significância 0,0104 e 0,0003.

Para a matéria seca de nódulos, foram encontrados, na metodologia analógica, os coeficientes de determinação da média e mediana de 0,97-0,95 e na metodologia digital de 0,89-0,78. Na metodologia analógica obteve-se efeito significativo apenas para número de nódulos para com níveis de significância <0,0001. Na metodologia digital foram encontrados na média efeito significativo para comprimento, diâmetro e número de nódulos com níveis de significância 0,0465, 0,0047 e 0,0105, respectivamente. Já na mediana o efeito significativo ocorreu apenas para diâmetro apresentando nível de significância 0,0150.

Observa-se na matéria seca da parte aérea que, apesar do coeficiente de determinação das regressões utilizando as determinações não destrutivas serem ligeiramente inferiores aos das destrutivas, 0,92-0,90 e 0,95-0,94, respectivamente, os modelos foram altamente significativos para os dois métodos de avaliação da nodulação. No entanto, os tamanhos dos nódulos apresentaram efeito significativo apenas para a mediana determinada pelo processo não destrutivo, com níveis de significância de 0,03 e 0,0005 para comprimento e diâmetro, respectivamente, ao passo que tanto para média quanto para mediana o procedimento convencional apresentava como único efeito significativo no modelo de regressão o número de nódulos.

Na matéria seca do sistema radicular na metodologia analógica obteve-se coeficiente de determinação de 0,94 na média e mediana e na digital os coeficientes de determinação foram de 0,90 – 0,85. Obtiveram-se efeito significativo na metodologia analógica apenas para o número de nódulos com nível de significância $<0,0001$ na média e mediana. Na metodologia digital o efeito significativo na média foi observado apenas para número de nódulos e na mediana para diâmetro com níveis de significância de 0,0077 e 0,0056, respectivamente.

No geral, pode-se observar que, para todas as variáveis relacionadas com o desenvolvimento das plantas, os efeitos significativos foram semelhantes para as duas metodologias, indicando a possibilidade do uso da metodologia digital. A mediana apresentou melhor comportamento do que a média quanto ao seu uso como preditora das variáveis analisadas, e as medições realizadas pela análise de imagem apresentaram resultados semelhantes quanto aos coeficientes de determinação e geralmente superiores quanto à importância de comprimento e diâmetro e número de observações no modelo.

Conclusão

A estimativa do comprimento e diâmetro dos nódulos, pela análise de imagens, apresentou resultados satisfatórios, permitindo que os nódulos sejam analisados ao longo do tempo sem que haja a necessidade da coleta das plantas.

Das três resoluções utilizadas na pesquisa, a que apresentou os melhores resultados foi a de 300 pontos por polegada.

A metodologia desenvolvida apresenta resultados comparáveis à medição destrutiva dos nódulos, com diferença significativa, mas inferior a um décimo de milímetro. Mesmo apresentando diferença é possível o uso da metodologia não destrutiva para determinação do comprimento e diâmetro de nódulos.

A mediana pode ser considerada como medida de tendência central preferível à média, e comprimento e diâmetro dos nódulos determinados pela nova metodologia apresentaram-se como melhores preditores de várias variáveis de desempenho da planta e da nodulação do que a medição convencional.

Agradecimento

Este trabalho fez parte da dissertação do primeiro autor no Programa de Pós-graduação em Agronomia-Ciência do Solo da UFRPE, com bolsa e ajuda de custo

da Capes, através do programa Prof-UFRPE. Os autores R.L.C. Ferreira e N.P. Stamford agradecem a bolsa de produtividade do CNPq. Os autores J.V.T. Costa e M. Campanharo agradecem as bolsas de mestrado da Capes. O autor C.A. Sousa agradece a bolsa de iniciação científica do CNPq.

Referências

- ARRESE-IGOR, C. *et al.* Sucrose synthase and nodule nitrogen fixation under drought and other environmental stresses. *Symbiosis*, Rehovot, v. 27, n. 3-4, p. 189-212, 1999.
- BANGEL, E.V. *et al.* Coleção de culturas de rizóbio SEMIA (FEPAGRO-MIRCEN). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 28., 2001. Londrina. *Anais...* Londrina: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2001. p. 68-68.
- CORDOVILLA, M.D.P. *et al.* Growth and nitrogen assimilation in nodules in response to nitrate levels in *Vicia faba* under salt stress. *J. Exp. Bot.*, Oxford, v. 47, n. 2, p. 203-210, 1996.
- DELGADO, M.L. *et al.* Effects of salt stress on growth and nitrogen fixation by pea, faba-bean, common bean and soybean plants. *Soil Biol. Biochem.*, Elmsford, v. 26, n. 3, p. 371-376, 1994.
- GRAHAM, P.H. Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. *Can. J. Microb.*, Ottawa, v. 38, n. 6, p. 475-484, 1992.
- HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. *The water-culture method for growing plants without soil*. Berkeley: California Agricultural Experiment Station, 1950.
- HUNGRIA, M.; FRANCO, A.A. Effects of high temperature on nodulation and nitrogen fixation by *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Soil*, The Hague, v. 149, n. 1, p. 95-102, 1993.
- HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T. Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. *Field Crops Res.*, Amsterdam, v. 65, n. 2, p. 151-164, 2000.
- LIRA JUNIOR, M.A.; SMITH, D.L. Use of a standard TWIN scanner and software for nodule number determination on different legume species. *Soil Biol. Biochem.*, Elmsford, v. 32, n. 10, p. 1463-1467, 2000.
- LIRA JUNIOR, M.A. *et al.* Effects of addition of flavonoid signals and environmental factors on nodulation and nodule development in the pea (*Pisum sativum*)–*Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* symbiosis. *Aust. J. Soil Res.*, Melbourne, v. 41, n. 2, p. 267-276, 2003.
- LIRA JUNIOR, M.A. *et al.* Effect of root temperature on nodule development of bean, lentil and pea. *Soil Biol. Biochem.*, Elmsford, v. 37, n. 2, p. 235-239, 2005.
- MIRANDA, P. *et al.* Feijão comum "Princesa" (*Phaseolus vulgaris* L.). In: EMPRESA PERNAMBUCANA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. *Cultivares recomendadas pelo IPA*. Recife: Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária, 2002. p. 21-22.

- MONTEALEGRE, C. *et al.* Preference in the nodulation of *Phaseolus vulgaris* cultivar RAB39. *Can. J. Microb.*, Ottawa, v. 41, n. 11, p. 992-998, 1995.
- MUNNS, D.N. Soil acidity and nodulation. In: ANDREW, C.S.; KAMPRATH, E.J. (Ed.). *Mineral nutrition of legumes in tropical and subtropical soils*. East Melbourne: Csiro, 1992. p. 247-263.
- NEVES, M.C.P.; HUNGRIA, M. The physiology of nitrogen fixation in tropical grain legumes. *Crit. Rev. Pl. Sci.*, Oxford, v. 6, n. 3, p. 267-321, 1987.
- PANZIERI, M. *et al.* Importance of the *Bradyrhizobium japonicum* symbiosis for the sustainability of a soybean cultivation. *Ecol. Model.*, Amsterdam, v. 135, n. 2, p. 301-310, 2000.
- PHILLIPS, D.A. Using rhizobia in the 21st century. *Symbiosis*, Rehas, v. 27, n. 1, p. 83-102, 1999.
- PIMENTEL-GOMES, F.; GARCIA, C.H. *Estatística aplicada a experimentos agronômicos e florestais*. Piracicaba: Fealq, 2002.
- SAS Institute, Inc. *The SAS System for Windows*. Cary: SAS Institute, Inc, 1999. CD-Rom.
- SILVEIRA, J.A.G.D. *et al.* Drought-induced effects and recovery of nitrate assimilation and nodule activity in cowpea plants inoculated with *Bradyrhizobium* spp. under moderate nitrate level. *Braz. J. Microbiol.*, Rio de Janeiro, v. 32, n. 3, p. 187-194, 2001.

Received on June 20, 2005.

Accepted on August 08, 2006.