

JOSÉ VALDEMIR TENÓRIO DA COSTA

**METODOLOGIA PARA ANÁLISE NÃO DESTRUTIVA DA
NODULAÇÃO**

RECIFE – PE

2005

JOSÉ VALDEMIR TENÓRIO DA COSTA

**METODOLOGIA PARA ANÁLISE NÃO DESTRUTIVA DA
NODULAÇÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte das exigências do Programa de Pós – Graduação em Ciência do Solo, para obtenção do título de Magister Scientiae.

RECIFE
PERNAMBUCO - BRASIL
2005

JOSÉ VALDEMIR TENÓRIO DA COSTA

**METODOLOGIA PARA ANÁLISE NÃO DESTRUTIVA DA
NODULAÇÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte das exigências do Programa de Pós – Graduação em Ciência do Solo, para obtenção do título de Magister Scientiae.

Orientador

Prof. Mario de Andrade Lira Junior, Ph.D.

Co – Orientadores

Prof. Newton Pereira Stamford, Dr.

Prof. Rinaldo Luiz Caraciolo Ferreira, Dr.

RECIFE
PERNAMBUCO - BRASIL
2005

Ficha catalográfica
Setor de Processos Técnicos da Biblioteca Central – UFRPE

C837m Costa, José Valdemir Tenório da
Metodologia para análise não destrutiva da nodulação / José Valdemir Tenório da Costa – 2005.
59 f. : il., tabs.

Orientador: Mario de Andrade Lira Junior
Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) –
Universidade Federal Rural de Pernambuco. Departamento de Agronomia.
Referências.

CDD 631.46

1. Microbiologia do solo
2. Rhizobium
3. Rizóbio
4. Fixação biológica de nitrogênio
 - I. Lira Júnior, Mario de Andrade
 - II. Título

METODOLOGIA PARA ANÁLISE NÃO DESTRUTIVA DA NODULAÇÃO

JOSÉ VALDEMIR TENÓRIO DA COSTA

Dissertação defendida e aprovada em 24 de fevereiro de 2005 pela banca
examinadora:

Orientador: _____

Prof. Ph.D. Mario de Andrade Lira Junior
DEPA/UFRPE

Examinadores: _____

Dr^a. Carolina Etienne de Rosália e Silva Santos
DEPA/UFRPE

Prof. Ph.D. Emidio Cantidio de Oliveira Filho
DEPA/UFRPE

Prof. Dr. Rinaldo Luiz Caraciolo Ferreira
DCFL/UFRPE

Deus não quer que subamos a montanha da vida a sós. Toda a nossa experiência nos ensina que temos um grande amigo invisível, mas muito real, que espera o momento em que nós cômnicos da nossa fraqueza nos voltemos para Ele, em busca da proteção e auxílio que Ele nos quer dar.

A Deus ofereço este trabalho

Aos meus pais Afonso Ferreira da Costa e Dolores Tenório da Costa, aos pais de meus pais e a meus irmãos e irmãs que me ensinaram mais do que eu jamais pude aprender e pelo exemplo de pessoas humanas que são.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus que em todos os momentos ilumina os caminhos que percorremos, em busca do bem estar comum e de um futuro promissor.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco e em especial ao Programa de Pós – Graduação em Ciência do Solo pela aceitação, infra-estrutura e formação profissional oferecida pelo quadro de professores e funcionários.

A coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela bolsa concedida.

Ao meu orientador, Prof. Ph.D. Mario de Andrade Lira Junior por compartilhar suas idéias, também seu tema de pesquisa, sendo um orientador disposto a oferecer estímulos e, principalmente, a percorrer novos caminhos, ouvir com interesse e ânimo todas as questões, dúvidas e problemas que surgiam durante a pesquisa, e pela coragem de ousar trabalhar com novas idéias e conceitos.

Ao Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo durante o primeiro ano de realização do Curso Prof. Dr. Fernando José Freire pela exemplar administração.

Ao atual Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo Prof. Ph.D Emidio Cantidio de Oliveira Filho pela excelente administração.

A vice Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo Prof. Dr^a Maria Betânia Galvão dos Santos Freire pela excelente administração, como educadora preocupada com o aprendizado de seus alunos e pelos ensinamentos e exemplo de solidariedade mostrada.

Aos Co-orientadores Professores Drs. Newton Pereira Stamford e Rinaldo Luiz Caraciolo Ferreira pela amizade, esclarecimentos e dedicação com a pesquisa.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo pelos ensinamentos transmitidos ao longo do curso.

Ao Laboratório de Microbiologia do Solo da Universidade Federal Rural de Pernambuco pela doação das estirpes utilizadas na pesquisa e pela realização das análises.

A Dr^a Carolina Etienne de Rosália e Silva Santos pela indicação na escolha das estirpes, sugestões e duvidas por ela esclarecidas.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciência do solo Maria do Socorro dos Santos Santana (Socorro), Severino dos Ramos Basto (Seu Noca) e

Josué Camilo de Melo por estarem sempre prontos a nos atender e pelo carinho e apoio.

Ao Prof. Dr. Geber Barbosa de Albuquerque Moura do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal Rural de Pernambuco pela amizade e apoio prestado.

Meus sinceros agradecimentos aos meus pais Afonso Ferreira da Costa e Dolores Tenório da Costa por terem sempre me apoiado e incentivado na busca de um futuro promissor.

Aos meus irmãos e irmãs: José, Afonso, Claudemir, Adson, Zelita, Zenita, Renilda, Ivanilda, Lenilda, Cristiane, Taciane e Lindinalva que sempre me apoiaram e incentivaram as minhas decisões, e aos meus sobrinhos e sobrinhas, tios e tias pelo carinho e amizade.

Ao amigo e irmão Luiz Henrique Paulino da Silva pela amizade, companheirismo e convivência harmoniosa.

Aos amigos Clayton Albuquerque de Sousa, Marcela Campanharo e Fabiana Aparecida da Silva Araújo pela ajuda incondicional que por vocês foi prestada na realização deste trabalho, desde o início do experimento até a conclusão da pesquisa, sem vocês a realização deste trabalho teria sido muito mais difícil.

Ao amigo Alexandre Tavares da Rocha pela amizade, sugestões, esclarecimentos e companheirismo durante o curso.

Aos amigos de turma: Arlete Cortês, Euzelina Inácio, Rita de Cássia, Gutemberg de Almeida, Romero Areias, Gledson Guedes, Eduardo Saldanha, Julio Guilherme Costa, Julio César Patrício, Isaac Leal, José de Castro e Luis Augusto pela amizade e convivência durante o curso.

Ao Prof. Dr. Gilson Moura Filho da Universidade Federal de Alagoas pelas orientações, estímulos e amizade inestimável como orientador de iniciação científica durante a graduação.

Aos amigos de iniciação científica da Universidade Federal de Alagoas Gutemberg de Almeida Costa, Cícero Gomes dos Santos e Leila Cruz da Silva pela amizade, carinho e convivência.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	III
SUMÁRIO	V
LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE TABELAS	VIII
RESUMO GERAL	IX
GENERAL ABSTRACT	XI
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	4
CAPÍTULO 1	8
RELACIONAMENTO ENTRE TAMANHO DO NÓDULO E MEDIÇÕES CONVENCIONAIS DA NODULAÇÃO	8
RESUMO	8
ABSTRACT	9
INTRODUÇÃO	10
MATERIAL E MÉTODOS	11
RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
Estimativa do comprimento e diâmetro dos nódulos em função das imagens analisadas nas diferentes resoluções	15
Comparação entre os nódulos visíveis e totais	17
Avaliação das variáveis	20
CONCLUSÕES	22
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23
CAPÍTULO 2	26
DESENVOLVIMENTO DE NÓDULOS E PLANTAS DE CAUPI DETERMINADO POR MÉTODOS DESTRUTIVO E NÃO DESTRUTIVO	26
RESUMO	26

ABSTRACT	27
INTRODUÇÃO	28
MATERIAL E MÉTODOS	30
RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
Análise destrutiva do desenvolvimento das plantas e da nodulação	31
Análise não-destrutiva do crescimento das plantas	33
Avaliação do desenvolvimento das plantas	34
Comparação entre metodologia destrutiva e não destrutiva	36
CONCLUSÕES	40
CONSIDERAÇÕES FINAIS	43

LISTA DE FIGURAS

- 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 vermelho indicam a presença e o tamanho dos nódulos visíveis. 13
- Figura 1.** Comparação de métodos de avaliação de desenvolvimento de plantas de caupi cultivadas em casa de vegetação. A – Avaliação do desenvolvimento da área foliar por métodos destrutivo e não-destrutivo. B – Avaliação do desenvolvimento da massa seca da parte aérea. 37
- Figura 2.** Comparação de métodos de avaliação de desenvolvimento de nódulos de caupi em plantas cultivadas em casa de vegetação. A – Avaliação do desenvolvimento do número de nódulos por métodos destrutivo e não-destrutivo. B – Avaliação do desenvolvimento de comprimento de nódulos por método não-destrutivo. C – Avaliação do desenvolvimento de massa seca de nódulos. 39

LISTA DE TABELAS

- 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. 16
- Tabela 2** – Níveis de significância para o teste 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. 18
- 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 massa fresca e seca de nódulos, massa seca da parte aérea e da raiz e nitrogenase como variáveis dependentes. 20
- Tabela 1** – Equação de regressão, coeficiente de determinação (R^2), máximo e coeficiente de variação (CV) para cada variável, considerando a idade da planta como variável independente. 32
- Tabela 2** – Equação de regressão, coeficiente de determinação (R^2), máximo para cada variável (máximo) e coeficiente de variação (CV) para altura de planta e área foliar determinados semanalmente. 34
- Tabela 3** – Equação de regressão considerando idade como variável independente, coeficiente de determinação (R^2), máximo para cada variável (máximo) e coeficiente de variação para as variáveis analisadas. 35

RESUMO GERAL

A simbiose entre leguminosas e rizóbio é a fonte mais importante de nitrogênio fixado biologicamente em sistemas agrícolas. Esta simbiose se caracteriza pela formação de nódulos nas raízes das plantas onde ocorre a fixação biológica de nitrogênio (FBN), e que sofrem diversos efeitos ambientais. A FBN nas leguminosas pode substituir os adubos nitrogenados, não depende de energia externa e tem poucos efeitos ambientais potencialmente adversos. No entanto, plantas dependentes da FBN costumam sofrer efeitos mais severos, para diversos estresses ambientais, do que plantas recebendo fertilizantes nitrogenados. Estes efeitos não são bem conhecidos, mas sabe-se que a nodulação e posterior desenvolvimento dos nódulos são pontos críticos na FBN. As medições feitas nos nódulos costumam ser realizada por métodos destrutivos, que tornam mais difíceis às estimativas de efeitos temporais porque não permitem que o pesquisador acompanhe uma mesma planta e também aumentam o tamanho dos experimentos devido às múltiplas colheitas necessárias. Deste modo, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver e avaliar um conjunto de técnicas experimentais, baseado no uso de análise de imagens, que permitam o acompanhamento de nódulos de leguminosas ao longo do tempo. O experimento foi conduzido com feijão caupi (*Vigna unguiculata* L.) em casa de vegetação iniciando-se aos sete dias após emergência até a maturidade fisiológica das plantas. Foram realizadas determinações semanais do número e tamanho dos nódulos, massa fresca e seca dos nódulos, área foliar, número de folhas, altura da planta, massa seca da parte aérea, massa seca do sistema radicular e atividade da nitrogenase. Os nódulos retirados manualmente foram digitalizados nas resoluções de 100, 200 e 300 pontos por polegada (ppp), e o comprimento e diâmetro de cada nódulo foram determinados com paquímetro eletrônico digital e posteriormente por análise de imagem. Digitalizações do sistema radicular de todas as plantas também foram realizadas semanalmente na resolução de 300 ppp. Os nódulos tiveram área, comprimento e diâmetro determinados, tanto naqueles retirados manualmente, quanto nos que puderam ser observados nos lados mais extensos do vaso. Os dados de tamanho de nódulos obtidos por análise de imagem e por medição convencional foram comparados por regressão e teste t pareado, e os dados de comprimento e diâmetro de nódulos foram utilizados em análise de regressão como variáveis independentes com as variáveis convencionalmente obtidas como variáveis dependentes.

Posteriormente foi efetuada análise de regressão com idade das plantas como variável independente tanto para os dados de produtividade de planta quanto para os dados de nódulos obtidos convencionalmente e pelo método não destrutivo. Para as três resoluções estudadas, os dois métodos de determinação apresentaram-se sem diferença significativa, com a resolução mais adequada sendo a de 300 ppp. As medições destrutivas e não destrutivas de comprimento e diâmetro de modo geral apresentaram pouca diferença para a maioria das variáveis descritoras, quando consideradas a cada idade na colheita, mas diferenças geralmente significativas quando as idades de colheita não foram consideradas. Comprimento e diâmetro dos nódulos pela determinação não destrutiva foram geralmente melhores descritores de massa seca da parte aérea, do sistema radicular e dos nódulos, bem como da nitrogenase do que comprimento e diâmetro obtidos por medições destrutivas, convencionais. As curvas de regressão para o desenvolvimento de nódulos indicam boa concordância de modo geral quando obtidas pelos métodos destrutivo e não-destrutivo, em particular quanto à previsão de aparecimento de nódulos e idade em que a máxima produção para cada variável foi encontrada. Dentre as variáveis ligadas ao tamanho do nódulo, a soma do comprimento apresentou melhores características quando comparada à massa seca dos nódulos. Deste modo, a metodologia proposta apresenta potencial de uso para avaliação do desenvolvimento de nódulos de leguminosas, embora algumas limitações possam ser observadas e precisam ser melhor avaliadas.

GENERAL ABSTRACT

Legume-rhizobia symbiosis is the most important source of biologically fixed nitrogen for agricultural systems. This symbiosis characterizes by nodule formation, in which biological nitrogen formation (BNF) occurs and which suffer environmental effects. BNF may substitute nitrogen fertilizer, does not depend on external energy sources, and had potentially deleterious environmental effects. That notwithstanding, BNF-dependent plants usually show stronger effects from various environmental stresses than plants receiving nitrogen fertilizer. These effects are not well known, but it is known that nodulation and later nodule development are one of BNF critical steps. Nodule measurements are usually based on destructive methods, which difficult temporal effects estimates, since they do not allow a single plant to be followed, and increase experiment size due to the multiple harvest requirement. This work had as objectives to develop and evaluate a set of experimental techniques, based on image analysis, to allow the following of legume nodules over time. The experiment was conducted with cowpea at a glasshouse, and from seven days after seed emergence up to plant physiological maturity weekly determinations of nodule number, size, fresh and dry matters, leaf area, plant height, aerial part and root system dry matters and nitrogenase activities were obtained. Nodules hand separated were scanned at 100, 200 and 300 dots per inch (dpi) resolutions, and length and diameter for each nodule determined with a digital pachymeter and with image analysis. Plant root systems were also weekly scanned at 300 dpi resolution. Nodules had area, length and diameter determined both on those hand separated and on those visible on the pot's sides. Nodule size data obtained by image analysis and conventional methods were compared by regression and paired samples t tests, and nodule length and diameter were used in regression analysis as independent variables with conventional measures of nodulation and plant development as dependent variables. Afterwards regression analysis was conducted with plant age as independent variable both for plant yield data and for nodule data obtained both conventionally and by non-destructive methods. For the three resolutions examined determination methods did not significantly differ, with the most adequate resolution being 300 dpi. Destructive and non-destructive measures generally presented small differences for most descriptive variables, when each harvest age was individually considered, but usually significant differences when harvest age was not considered. Non-destructive nodule length and diameter were generally better descriptors of

aerial part, root system and nodules dry mass and nitrogenase activity than those obtained by conventional, destructive methods. Regression curves for nodule development obtained by destructive and non-destructive methods are similar, in special in regards to nodule appearance prevision and age for maximum value for each variable. Among nodule size variables length sum had the best characteristics when compared with nodule dry mass. So the proposed methodology has potential for legume nodule development evaluation, but some limitations are observed which require better evaluation.

INTRODUÇÃO GERAL

A disponibilidade de nitrogênio é provavelmente o segundo maior limitante à produção agrícola, perdendo apenas para deficiência hídrica (Date, 2000; Graham & Vance, 2000). A simbiose entre leguminosas e rizóbio permite que muitas espécies adquiram, ao menos parcialmente, sua nutrição nitrogenada da atmosfera. No entanto, a quantificação do nitrogênio fixado é difícil, tanto em termos econômicos (Lanyon, 1995) quanto ecológicos (Hoglund & Brock, 1987; Panzieri et al., 2000), mas estima-se que seja responsável por 45 % (Danso, 1995) a 85 % (Vance et al., 1988) da fixação biológica de nitrogênio em áreas agrícolas. Cerca de 80 milhões de toneladas de nitrogênio é fixado mundialmente por ano, comparadas com cerca de 82 milhões de toneladas obtidas por fixação industrial (Lanyon, 1995; Halbleib & Ludden, 2000).

Esta simbiose destaca-se devido à sua importância econômica e pela maior eficiência do processo de fixação decorrente de uma parceria mais evoluída entre macro e microssimbiontes (Siqueira & Moreira, 2001).

Como este é um processo biológico, não depende de energia externa exceto a solar, e tem poucos efeitos ambientais potencialmente adversos (Phillips, 1999). Já a produção de fertilizantes nitrogenados depende de combustíveis fósseis (Boddey et al., 1997). Além disto o uso extensivo de fertilizantes nitrogenados tende a ser ineficiente, com taxas de aproveitamento de até 50% do nitrogênio aplicado. Além da perda deste insumo, parte do nitrogênio não absorvido vai para lençóis freáticos, rios e mares, gerando problemas ecológicos e de saúde (Graham & Vance, 2000; Andrade et al., 2001).

A simbiose leguminosa-rizóbio se caracteriza pela formação de estruturas radiculares especiais denominadas nódulos, em que ocorre a fixação de nitrogênio pelos bacteróides. A simbiose é estabelecida quando a bactéria infecta e nodula o hospedeiro, o que depende de propriedades intrínsecas dos simbiotes, bem como da ação exercida pelos fatores ambientais, isoladamente ou através de suas interações (Siqueira & Franco, 1988)

A nodulação é um processo complexo, que ocorre em várias etapas, envolvendo mudanças fisiológicas e morfológicas tanto nas células hospedeiras como nas bactérias. As mudanças nas bactérias visam principalmente o recebimento de fontes de carbono da planta hospedeira, para prover o ATP e o poder redutor necessário para o processo de fixação biológica. As mudanças nas

plantas hospedeiras visam principalmente assimilar a amônia produzida pelas bactérias.

Inicialmente diversos compostos são exsudados pelas plantas hospedeiras, como aminoácidos, açúcares e flavonóides, que agem como substâncias quimiotáticas, atraindo o rizóbio e induzindo a produção e exsudação de lipochitooligossacarídeos que funcionam como sinais moleculares para a leguminosa (Dharmatilake & Bauer, 1992).

O tempo de aparecimento dos nódulos é variável com as espécies de leguminosas e estirpes de rizóbio. Geralmente de cinco a dez dias após a germinação, já existem nódulos visíveis, e a fixação do nitrogênio é detectada de quatro a dez dias após o aparecimento dos nódulos. Em algumas espécies, como o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*), as plantas só mostram sinais evidentes de que estão sendo beneficiadas pela simbiose dez a quinze dias após a germinação (Vargas et al, 2000).

O processo de fixação biológica de N_2 atinge seu ponto máximo no estágio de floração plena e declina a partir do enchimento dos grãos, participando do suprimento de N durante todo o ciclo da cultura. Os nódulos presentes na região do colo da raiz principal são formados logo após a emergência das plantas e são provenientes das estirpes inoculadas. Ao contrário, nódulos presentes nas raízes secundárias são indícios de que a nodulação ocorreu tardiamente com estirpes que já se encontravam no meio (Vargas, 1990).

A fixação do nitrogênio é complexa, e muito sensível aos efeitos ambientais. Sabe-se que muitos efeitos ambientais, tais como nitrogênio disponível (Müller & Pereira, 1995; Bandyopadhyay et al., 1996; Burity et al., 1996; Arrese-Igor et al., 1997; Gulden & Vessey, 1998; Arias et al., 1999; Leidi & Rodriguez-Navarro, 2000; Lira Junior et al, 2003), acidez do solo (Anyango et al., 1995; Tang & Thomson, 1996; Sfredo et al., 1996; Date, 2000; Graham & Vance, 2000; Hungria & Vargas, 2000; Andrade et al., 2002; Martins et al., 2003) e disponibilidade de fósforo (Sfredo et al., 1996; Boddey et al., 1997; Leidi & Rodriguez-Navarro, 2000; Araújo et al., 2000; Andrade et al., 2001; Christiansen & Graham, 2002) afetam leguminosas dependentes da fixação do nitrogênio de forma mais severa do que aqueles que não dependem da fixação (Date, 2000).

Apesar destes efeitos serem bastante conhecidos, seus mecanismos de atuação ainda não são bem entendidos na maioria dos casos. Sabe-se que uma das prováveis causas da redução da fixação biológica do nitrogênio sob condições de

estresse ambiental é uma redução no desenvolvimento dos nódulos, conforme observado para a ervilha na presença de elevados teores de nitrogênio disponível ou de salinidade excessiva na solução nutritiva (Lira Junior et al., 2003) e para ervilha, feijão e lentilha na presença de baixas temperaturas do solo (Lira Junior et al., 2005).

A utilização da análise de imagem apresenta potencial para o acompanhamento do processo de formação e desenvolvimento da nodulação e do sistema radicular, por permitir acompanhar a formação e o desenvolvimento dos nódulos, permitindo que essas imagens sejam armazenadas. Posteriormente através das imagens podem ser realizadas a quantificação e determinação do tamanho e diâmetro individual, distribuição espacial e número dos nódulos visíveis, tamanho do sistema radicular da cultura, sem que ocorra perda do volume do substrato de cultivo ou raízes, sem causar danos ao sistema radicular e parte aérea da planta no meio em que estão sendo cultivadas. Desta forma os efeitos ambientais podem ser observados e identificados, possibilitando a melhor observação desta interação biológica entre os rizóbios e as leguminosas e sua inter-relação com o meio em que estão ou foram cultivados e o efeito ambiental em estudo. 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.

Para facilitar a discussão dos resultados o trabalho foi dividido em capítulos, sendo o primeiro capítulo intitulado Relacionamento entre tamanho do nódulo e medições convencionais da nodulação e o segundo capítulo como: Desenvolvimento de nódulos e plantas de caupi determinado por métodos destrutivos e não-destrutivos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, D. S.; MURPHY, P. J.; GILLER, K. E. Effects of liming and legume/cereal cropping on populations of indigenous rhizobia in an acid Brazilian oxisol. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 34, p. 477-485, 2002.
- ANDRADE, M. D.; ALVARENGA, P. D.; SILVA, R. D.; CARVALHO, J. D.; JUNQUEIRA, A. D. D. A. Resposta do feijoeiro às adubações nitrogenada e molíbdica e à inoculação com *Rhizobium tropici*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, p. 934-940, 2001.
- ANYANGO, B.; WILSON, K. J.; BEYNON, J. L.; GILLER, K. E. Diversity of rhizobia nodulating *Phaseolus vulgaris* L. in two Kenyan soils with contrasting pHs. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, p. 4016-4021, 1995.
- ARAÚJO, A. P.; TEIXEIRA, M. G.; ALMEIDA, D. D. Growth and yield of common bean cultivars at two soil phosphorus levels under biological nitrogen fixation. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, p. 809-817, 2000.
- ARIAS, H. O. R.; DE LA VEGA, L.; RUIZ, O.; WOOD, K. Differential nodulation response and biomass yield of Alexandria clover as affected by levels of inorganic nitrogen fertilizer. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 22, p. 1233-1239, 1999.
- ARRESE-IGOR, C.; MINCHIN, F. R.; GORDON, A. J.; NATH, A. K. Possible causes of the physiological decline in soybean nitrogen fixation in the presence of nitrate. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 48, p. 905-913, 1997.
- BANDYOPADHYAY, A. K.; JAIN, V.; NAINAWATEE, H. S. Nitrate alters the flavonoid profile and nodulation in pea (*Pisum sativum* L.). **Biology and Fertility of Soils**, New York, v. 21, p. 189-192, 1996.
- BODDEY, R. M.; SÁ, J. C.; ALVES, B. J.; URQUIAGA, S. The contribution of biological nitrogen fixation for sustainable agricultural systems in the tropics. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 29, p. 787-799, 1997.
- BURITY, H. A.; CHAMBER-PEREZ, M.; LIRA JUNIOR, M. A.; FIGUEIREDO, M. D. V. B.; LYRA, M. D. C. C. P. D. Effect of nitrate on nodulation and N₂-fixation of

Lupinus mutabilis mutants at different growth stages. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 27, p. 92-99, 1996.

CHRISTIANSEN, I.; GRAHAM, P. H. Variation in di-nitrogen fixation among Andean bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes grown at low and high levels of phosphorus supply. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 73, p. 133-142, 2002.

DANSO, S. K. A. Assessment of biological nitrogen fixation. **Fertilizer Research**, The Hague, v. 42, p. 33-41, 1995.

DATE, R. A. Inoculated legumes in cropping systems of the tropics. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 65, p. 123-136, 2000.

DHARMATILAKE, A. J.; BAUER, W. D. Chemotaxis of *Rhizobium meliloti* towards nodulation gene-inducing compounds from alfalfa roots. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v 58, p. 1153-1158, 1992.

GRAHAM, P. H.; VANCE, C. P. Nitrogen fixation in perspective: an overview of research and extension needs. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 65, p. 93-106, 2000.

GULDEN, R. H.; VESSEY, J. K. Low concentrations of ammonium inhibit specific nodulation (nodule number g^{-1} root DW) in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). **Plant and Soil**, The Hague, v. 198, p. 127-136, 1998.

HALBLEIB, C. M.; LUDDEN, P. W. Regulation of biological nitrogen fixation. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 130, p. 1081-1084, 2000.

HOGLUND, J. H., BROCK, J. L. Nitrogen fixation in managed grasslands. In: SNAYDON, R. W. Managed grasslands. Analytical studies. Amsterdam: **Elsevier Science**, 1987.p 187-196.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T. Environmental factors affecting N_2 fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 65, p. 151-164, 2000.

LANYON, L. E. Does nitrogen cycle Changes in the spatial dynamics of nitrogen with industrial nitrogen fixation. **Journal of Production Agriculture**, Madison, v. 8, p. 70-78, 1995.

LEIDI, E. O.; RODRIGUEZ-NAVARRO, D. N. Nitrogen and phosphorus availability limit N₂ fixation in bean. **New Phytologist**, Cambridge, v. 147, p. 337-346, 2000.

LIRA JUNIOR, M. A.; COSTA, C.; SMITH, D. L. Effects of addition of flavonoid signals and environmental factors on nodulation and nodule development in the pea (*Pisum sativum*)–*Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* symbiosis. **Australian Journal of Soil Research**, Melbourne, v. 41, p. 267-276, 2003.

LIRA JUNIOR, M. A.; LIMA, A. S. T.; ARRUDA, J. R. F.; SMITH, D. L. Effect of root temperature on nodule development of bean, lentil and pea. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 37, p. 235-239, 2005.

MARTINS, M. L., SILVA, T. R. B., SORATTO, R. P., LEMOS, L. B. Resposta do feijoeiro ao nitrogênio em cobertura e molibdênio via foliar em plantio direto. In: Congresso Brasileiro de Ciência do Solo, 29., 2003, Ribeirão Preto. **Anais: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**, 2003. CD-ROM.

MÜLLER, S. H.; PEREIRA, P. A. A. Nitrogen fixation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by mineral nitrogen supply at different growth stages. **Plant and Soil**, The Hague, v. 177, p. 56-61, 1995.

PANZIERI, M.; MARCHETTINI, N.; HALLAM, T. G. Importance of the *Bradhyrhzobium japonicum* symbiosis for the sustainability of a soybean cultivation. **Ecological Modelling**, Amsterdam, v. 135, p. 301-310, 2000.

PHILLIPS, D. A. Using rhizobia in the 21st century. **Symbiosis**, Rehovot, v. 27, p. 83-102, 1999.

SFREDO, G. J. E.; PALUDZYSZYN FILHO, E.; GOMES, E. R.; OLIVEIRA, M. C. N. D. Resposta da soja a fósforo e a calcário em Podzólico Vermelho-Amarelo de Balsas, MA. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 20, p. 429-432, 1996.

SIQUEIRA, J. O.; FRANCO, A. A. **Biotechnologia do solo: fundamentos e perspectivas**. Brasília: MEC, 1988.

SIQUEIRA, J. O., MOREIRA, F. M. DE O. Fixação Biológica do Nitrogênio atmosférico. In: MOREIRA, F. M. DE O., SIQUEIRA, J. O. **Biologia e bioquímica do solo**. Lavras: UFLA, 2001.p 90-121.

TANG, C.; THOMSON, B. D. Effects of solution pH and bicarbonate on the growth and nodulation of a range of grain legume species. **Plant and Soil**, The Hague, v. 186, p. 321-330, 1996.

VANCE, C. P., HEICHEL, G. H., PHILLIPS, D. A. Nodulation and symbiotic dinitrogen fixation. In: Hanson, A. A., Barnes, D. K., Hill, R. R. Alfalfa and alfalfa improvement. Madison: **American Society of Agronomy/Crop Science Society of America/Soil Science Society of America**, p 229-257, 1988.

VARGAS, M.A.T. Competitiveness and rizosphere colonization of Bradyrhizobium sp strains on chickpea. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasilia, v. 25. p 599-607, 1990.

VARGAS, M. A. T.; MENDES, I. C.; HUNGRIA, M. Response of field-grown bean (*Phaseolus vulgaris* L.) to *Rhizobium* inoculation and nitrogen fertilization in two Cerrados soils. **Biology and Fertility of Soils**, New York, v. 32, p. 228-233, 2000.

CAPÍTULO 1

RELACIONAMENTO ENTRE TAMANHO DO NÓDULO E MEDIÇÕES CONVENCIONAIS DA NODULAÇÃO¹

Costa, J.V.T.²; Lira Junior, M. A.^{3,4}; Ferreira, R. L. C.³; Stamford, N.P.³;
Campanharo, M.⁵; Araújo, F.A.S.⁶; Sousa, C.A.⁶

RESUMO

A simbiose entre leguminosas e rizóbios se caracteriza pela formação de nódulos em que ocorre a fixação biológica do nitrogênio, e que sofrem diversos efeitos ambientais. As medições feitas nos nódulos costumam ser baseada em métodos destrutivos, que tornam mais difícil à estimativa de efeitos temporais. Deste modo foi desenvolvido e avaliado um conjunto de técnicas experimentais, baseado no uso de análise de imagens, para permitir o acompanhamento de nódulos de leguminosas ao longo do tempo. Foi conduzido um experimento com feijão caupi em casa de vegetação em que a partir dos sete dias após emergência até a maturidade fisiológica das plantas foram realizadas determinações semanais de número de nódulos, tamanho, massa fresca e seca dos nódulos, área foliar, número de folhas, altura da planta, massa seca da parte aérea, massa seca do sistema radicular e atividade da nitrogenase. Os nódulos retirados manualmente foram digitalizados nas resoluções de 100, 200 e 300 pontos por polegada (ppp), e o comprimento e diâmetro de cada nódulo foram determinados com paquímetro eletrônico digital e usados posteriormente por análise de imagem. Digitalizações do sistema radicular de todas as plantas também foram realizadas semanalmente na resolução de 300

¹ Trabalho apresentado como parte da dissertação do primeiro autor junto ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo da UFRPE. Trabalho financiado por bolsa de Mestrado e auxílio de custo pela CAPES através do Programa PROF/UFRPE

² Engenheiro Agrônomo, MSc em Agronomia-Ciência do Solo. Correntemente aluno de doutorado no Programa de Pós - Graduação em Agronomia – Ciência do Solo da UFRPE. jvtcnovo@hotmail.com

³ Professor Adjunto da UFRPE. mliraj@ufrpe.br, rinaldof@ufrpe.br, newtonps@ufrpe.br

⁴ Autor para contato. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, Av. D. Manoel de Medeiros S/N. Dois Irmãos, Recife, PE. 52171-900. mliraj@ufrpe.br

⁵ Engenheira Agrônoma, Discente do Mestrado do Programa de Pós - Graduação em Agronomia - Ciência do Solo da UFRPE. marcelaufprpe@yahoo.com.br

⁶ Discente de Agronomia, UFRPE. fasaraujo@hotmail.com; claytondesousa@hotmail.com

ppp. Foram realizadas regressões para comprimento e diâmetro medidos convencionalmente e por análise de imagem nas diferentes resoluções e comparados resultados obtidos pelo sistema destrutivo e não destrutivo. As medições destrutivas e não destrutivas de comprimento e diâmetro de modo geral apresentaram pouca diferença para a maioria das variáveis descritoras, quando consideradas a cada idade na colheita. Comprimento e diâmetro dos nódulos pela determinação não destrutiva foram geralmente melhores descritores de massa seca da parte aérea, do sistema radicular e dos nódulos, bem como da nitrogenase do que comprimento e diâmetro obtidos por medições destrutivas, convencionais. Deste modo, a metodologia proposta apresenta potencial de uso para avaliação do desenvolvimento de nódulos de leguminosas.

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

ABSTRACT

The legume-rhizobia symbiosis is characterized by formation of nodules where nitrogen biological fixation occurs and which suffer several environmental effects. Nodule measurements are usually destructive, and temporal effect estimation is usually more difficult. So, a combination of experimental techniques based on image analysis was developed to allow continued observation over time of the same nodules. An experiment was conducted with cowpea on a glasshouse on which from seven days after emergence up to physiological maturity weekly determinations of nodule number, size, fresh and dry matter, leaf area, aerial part and root system dry matters and nitrogenase activities were obtained. Nodules were hand separated and digitized at 100, 200 and 300 dots per inch (dpi) resolutions, and individual nodule length and diameter measured manually, and later via image analysis. Root systems were weekly digitized at 300 dpi resolution. Regressions were obtained for nodule length and diameter determined by both systems, and results compared for nodule determination by the destructive and non-destructive methods. Destructive and non-destructive measurements were generally non-significantly different for most of the descriptive variables, when considered at each harvest date. Nodule length and diameter were generally better descriptors of aerial part, root system and nodule dry matter, as well as nitrogenase activity, than nodule length and diameter destructively obtained. So, the proposed methodology has potential for nodule development evaluation use.

Key Words: image analysis, rizobia, rhizobium, nitrogen fixation, BNF

INTRODUÇÃO

A grande importância da fixação biológica do nitrogênio é devida as indubitáveis vantagens econômicas e ecológicas derivadas deste 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; Panzieri 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 & Vargas, 2000), os mecanismos causais de modo geral não são bem conhecidos.

Um efeito comum de condições ambientais desfavoráveis à simbiose é uma redução no tamanho dos nódulos (Hungria & Franco, 1993) e na velocidade de desenvolvimento dos mesmos (Lira Junior & Smith, 2000; Lira Junior et al., 2003; Lira Junior et al., 2005)

A maioria dos estudos conduzidos até o momento basearam-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 avaliados e comparados. Para melhor estudar este sistema biológico e sua interação com o meio é de fundamental importância conhecer melhor os nódulos e sua interação com a planta e o meio (Date, 2000).

Recentemente trabalhos realizados com ervilha e outras espécies de leguminosas descreveram métodos baseados em análise de imagem que permitem medições não destrutivas de nódulos (Lira Junior & Smith, 2000; Lira Junior et al., 2003). No entanto, estes trabalhos utilizaram esta técnica em amostragem destrutiva como ferramenta para permitir a determinação do tamanho dos nódulos de forma mais acurada e sem a limitação de tempo inerente à determinação convencional.

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. Esta 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 efeito da acidez do solo, por

exemplo que é um fator de muita importância afetando mais de 800 milhões de hectares na América Latina (Graham, 1992).

Sabe-se que as raízes e os nódulos não se desenvolvem adequadamente em solos muito ácidos. Entre os fatores de acidez, a toxicidade de alumínio (Pavan et al., 1982) e a deficiência de cálcio (Ritchey et al., 1982) têm sido apontadas como os mais consideráveis na restrição do crescimento radicular e da nodulação. Esse efeito da acidez em si, dependendo do tipo de solo, as deficiências nutricionais normalmente associadas às condições ácidas, como deficiência de cálcio, magnésio, molibdênio e fósforo e a toxidez provocada pela elevação nos níveis de alumínio e manganês são fatores limitantes à cultura e conseqüentemente à simbiose (Scholles et al., 1981; Ribeiro Júnior, et al., 1987; Miguel & Moreira, 2001).

Por causa dos efeitos ambientais nos nódulos após sua formação poderá ainda ter uma redução no tamanho e número de nódulos em função do estresse ambiental, este efeito era normalmente observado com medidas destrutivas, devido à dificuldade de obtenção de medidas não destrutivas sobre os nódulos (Hungria & Franco, 1993; Delgado et al., 1994; Cordovilla et al., 1996; Arrese-Igor et al., 1999; Silveira et al., 2001).

Deste modo, este trabalho tem 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 UFRPE, Recife, 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 (D-23) medindo 20x7x1cm para evitar perda do substrato de crescimento. Estes 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 crescidos em meio YM contendo 10^9 células de rizóbio para cada semente, como descrito por (Bangel et al., 2001). 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 & 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 semeadura foi retirado um vaso de cada repetição a cada semana para obtenção de número de nódulos, tamanho (comprimento e diâmetro), massa fresca e seca dos nódulos, área foliar, número de folhas, altura da planta, massa seca da parte aérea, massa seca do sistema radicular e atividade da nitrogenase pelo método de redução de acetileno e determinação do etileno por cromatografia de gás (Hardy et al., 1973).

Os nódulos retirados foram digitalizados em bandeja de vidro de modo a evitar seu esmagamento pela tampa do digitalizador (Lira Junior & Smith, 2000). Digitalizações "in situ" do sistema radicular de todas as plantas foram realizadas semanalmente na resolução de 300 pontos por polegada (ppp), aproximadamente 118 pontos por centímetro, 24-bits de cor nos dois lados mais extensos de cada vaso. 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, sendo as imagens utilizadas para determinação do comprimento e diâmetro de cada nódulo, de acordo com Lira Junior & Smith (2000). Os mesmos nódulos tiveram comprimento e diâmetro determinados através do uso de paquímetro eletrônico digital.

Os nódulos tiveram comprimento e diâmetro determinados (Lira Junior & 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 como podem ser observados no exemplo da Figura 1 desenvolvimento do sistema radicular e da nodulação desde a emergência até a maturidade fisiológica da planta.

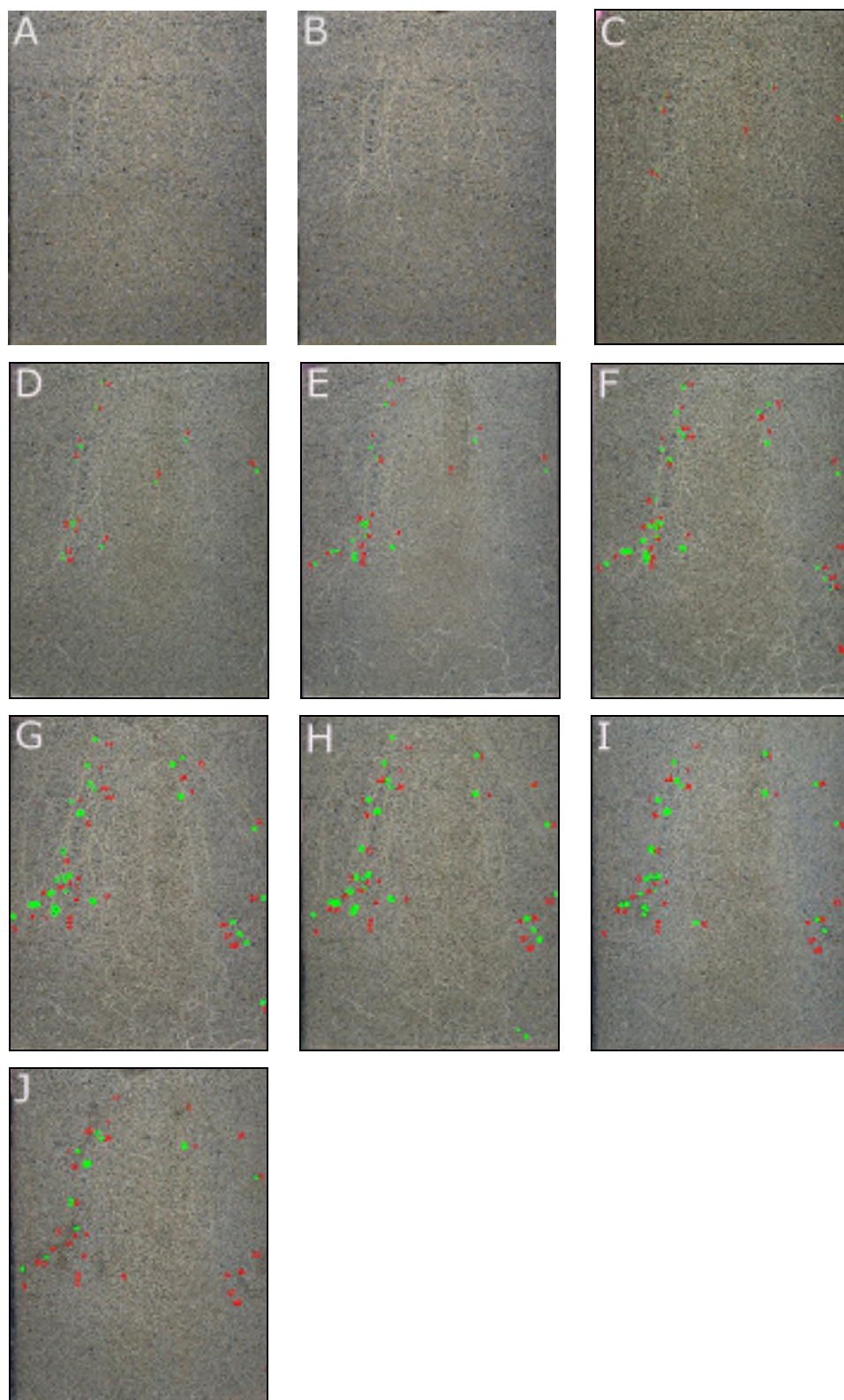


Figura 1. Desenvolvimento do sistema radicular e da nodulação dos 7 aos 70 dias após a emergência. Dias após a emergência (A) 7, (B) 14, (C) 21, (D) 28, (E) 35, F (42), G (49), H (56), I (63), J (70). Pontos em vermelho indicam a presença e o tamanho dos nódulos visíveis.

A parte aérea, sistema radicular e nódulos de cada planta foram acondicionados em sacos de papel separados, etiquetados e levados para secagem em estufa com circulação de ar, a 70 °C até massa seca constante, para obtenção da massa seca da parte aérea e do sistema radicular (g/planta). Foram também procedidas avaliações das variáveis referentes à nodulação, como número de nódulos por plantas, massa fresca e seca de nódulos (mg/planta) e atividade da nitrogenase ($\text{nmol C}_2\text{H}_4 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{planta}$).

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 digital Starrett® série 727 com seis polegadas.

Os dados coletados foram analisados em etapas diferenciadas. A primeira etapa de análise consistiu na avaliação da adequação do uso de medições por análise de imagem, para determinação de tamanho (comprimento e diâmetro) de nódulos. Para este fim foram comparadas as determinações feitas com paquímetro digital em 1196 nódulos de caupi individualmente identificados, com imagens obtidas 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 & Smith (2000). Estes dados foram submetidos à análise de regressão considerando as medições digitais como variáveis independentes e as medições convencionais como dependentes.

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° Quartil, Mediana, 3° 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. Estes 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: massa fresca e seca de nódulos, massa seca da parte aérea e do sistema radicular e atividade da nitrogenase.

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 & Garcia (2002) estes coeficientes de variação são considerados precisos de modo que os resultados obtidos são fidedignos (Tabela 1). Estes resultados, no entanto, foram os menos favoráveis quando comparados com as demais resoluções estudadas.

Mesmo assim, estes 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 desta 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, o que dificilmente vai acontecer em imagens que foram obtidas em resoluções superiores como as demais estudadas neste trabalho (200 e 300 ppp).

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 nesta resolução apresentam boa definição, ocupam relativamente pouco espaço, permitem digitalização relativamente rápida e atendem satisfatoriamente as necessidades da pesquisa realizada.

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). Esta 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. Mas é a que apresenta a melhor relação entre as medidas pelo método analógico e pelo método digital. Para novos trabalhos realizados usando esta metodologia de análise de imagens esta resolução deve ser a indicada, por apresentar estas características.

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
Comprimento na resolução 100	$comp = 0,45 + 0,76 (comp\ 100)$	0,89	15%
Comprimento na resolução 200	$comp = 0,30 + 0,81 (comp\ 200)$	0,91	14%
Comprimento na resolução 300	$comp = 0,21 + 0,84 (comp\ 300)$	0,92	14%
Diâmetro na resolução 100	$diam = -0,39 + 1,32(diam\ 100) - 0,01(diam\ 100)^2$	0,86	23%
Diâmetro na resolução 200	$diam = -0,11 + 1,21(diam\ 200) - 0,01(diam\ 200)^2$	0,88	20%
Diâmetro na resolução 300	$diam = -0,001 + 1,16(diam\ 300) - 0,07(diam\ 300)^2$	0,89	18%

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 (100, 200 e 300 ppp) indicando que qualquer uma das resoluções pode ser utilizada para estas determinações.

Para as três resoluções analisadas (100, 200 e 300 ppp) não foi observada diferença entre elas com relação aos resultados obtidos, porém a resolução de 300 ppp apresenta imagens com melhores definições que as demais resoluções inferiores analisadas neste trabalho.

Com relação às metodologias estudadas (análise não destrutiva e destrutiva) foi observada diferença significativa entre elas, porém com pequena magnitude, e diferença absoluta inferior a um décimo de milímetro. Mesmo apresentando diferença é possível a o uso da metodologia não destrutiva para determinação do comprimento e diâmetro de nódulos. Desta forma a metodologia usada para estas

determinações permite informações suficientemente seguras de que o comprimento e diâmetro dos nódulos podem ser determinados através da análise de imagens.

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. Desta forma, considerando-se o nível de significância de 5%, poderemos aceitar que os métodos apresentaram estimativas não diferentes se encontrarmos valores acima de 0,05 para a diferença entre os resultados obtidos para todos os nódulos e apenas para os nódulos visíveis, enquanto que valores menores indicam que os métodos apresentaram comportamento diferenciado.

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 estão 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 as medidas de dispersão (variância, assimetria, curtose e normalidade), os valores na Tabela 2 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 para variância, mas não para as demais épocas de colheita.

Os valores para assimetria mostram que aos 28 e 35 dias e para curtose aos 28 dias indicaram que 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 fase de desenvolvimento e senescência dos nódulos, baseado nos resultados obtidos para estas variáveis analisadas.

Tabela 2 – Níveis de significância para o teste 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
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
P 95	0.21	0.01	0.24	0.27	0.09	0.62	0.21	0.13	0.44
P 90	0.26	0.06	0.80	0.65	0.53	0.81	0.50	0.20	0.44
P 10	0.86	0.06	0.09	0.06	0.03	0.01	0.05	0.24	0.10
P 5	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
n° obs	<0,0001	0.01	<0,0001	0.02	0.01	<0,0001	<0,0001	0.02	0.09
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
P 95	0.15	0.01	0.47	0.50	0.09	0.84	0.41	0.12	0.58
P 90	0.15	0.05	0.70	0.98	0.36	0.80	0.70	0.19	0.60
P 10	0.97	0.40	0.08	0.15	0.04	0.01	0.03	0.21	0.25
P 5	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, N° obs = número de observações.

Para as medidas separatrizes foram analisados os quartis e percentis. Para o 1° 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, devido à competição por carbono orgânico entre os nódulos e as vagens da planta, o que pode ter levado à diferença significativa entre as imagens nestas épocas de colheita (Neves & Hungria, 1987). Já para o 3° Quartil não ocorreu diferença significativa entre os dois métodos de determinação para comprimento e diâmetro de nódulos.

Para o Percentil 95 com base nos valores que podem ser observados na 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 encontrados valores que indicasse que houve diferença significativa 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 para as demais variáveis analisadas das medidas separatrizes 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.

Avaliação das variáveis

Na Tabela 3 pode ser observada a comparação entre comprimento e diâmetro dos nódulos, determinados tanto pelo sistema convencional como através da análise de imagens e massa fresca e seca de nódulos, massa seca da parte aérea e da raiz e nitrogenase, 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, com exceção para a variável nitrogenase que apresentou resultado superior para a média no método digital, 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).

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 massa fresca e seca de nódulos, massa seca da parte aérea e da raiz e nitrogenase como variáveis dependentes.

	MF nódulos		MS nódulos		MS parte aérea		MS raiz		Nitrogenase	
	Ana	Dig	Ana	Dig	Média		Ana	Dig	Ana	Dig
R²	0.9770	0.8932	0.9719	0.8867	0.9527	0.9185	0.9412	0.9002	0.6272	0.6505
Comp	0.1283	0.0423	0.2592	0.0465	0.3391	0.5762	0.0552	0.3851	0.8989	0.0176
Diam	0.6550	0.0041	0.6485	0.0047	0.5731	0.1703	0.1697	0.1590	0.8519	0.0087
N° obs	<0.0001	0.0093	<0.0001	0.0105	<0.0001	0.0085	<0.0001	0.0077	0.1723	0.3943
					Mediana					
R²	0.9462	0.8327	0.9488	0.7828	0.9426	0.9029	0.9363	0.8499	0.6109	0.5942
Comp	0.0266	0.0104	0.2331	0.1314	0.4953	0.0366	0.2028	0.0544	0.7609	0.1143
Diam	0.2587	0.0003	0.5537	0.0150	0.8277	0.0005	0.2101	0.0056	0.8507	0.0485
N° obs	<0.0001	0.2641	<0.0001	0.1938	<0.0001	0.0726	<0.0001	0.1645	0.1340	0.3482

Mf e MS nódulos = massa fresca e seca de nódulos, MS parte aérea = massa seca da parte aérea, Ms raiz = massa seca da raiz, Ana = analógico, Dig = digital. Transformações das variáveis analisadas pelo método analógico levando em consideração a média: massa seca da parte aérea e massa seca da raiz pelo Log 10, nitrogenase **-6.4, para a mediana as transformações foram: massa fresca e seca de nódulos **0.3, massa seca da parte aérea e da raiz pelo Log 10, nitrogenase **-6.3. Transformações das variáveis analisadas pelo método digital levando em consideração a média: massa fresca e seca de nódulos, massa seca da parte aérea e massa seca da raiz pelo Log 10, nitrogenase **-6.2, para a mediana as transformações foram: massa fresca e seca de nódulos, massa seca da parte aérea e da raiz pelo Log 10, nitrogenase **-6.2. Níveis de significância para comprimento, diâmetro e número de nódulos, respectivamente.

Estes valores indicam que as determinações das variáveis analisadas podem ser realizadas com qualquer uma das duas metodologias quando levar em consideração os coeficientes de determinação para as variáveis analisadas nesta seção do trabalho, validando a importância de cada uma das metodologias utilizada para esta finalidade.

Os coeficientes de determinação, como podem ser verificados na Tabela 3, estão acima de 0,88 com exceção da nitrogenase que apresentou (R^2) inferior a 0,70 para os dois métodos de determinação, sendo estes os menores coeficientes de determinação encontrados para as variáveis analisadas.

Com relação ao nível de significância analisando os resultados obtidos pelo uso do método analógico (convencional), para massa fresca e seca de nódulos e massa seca da parte aérea e da raiz, verifica-se que só ocorreu diferença para o número de observações, não ocorrendo diferença significativa para os demais. Já para nitrogenase não foram observadas diferenças para nenhuma das variáveis em estudo, utilizando as medições convencionais.

Para as mesmas variáveis analisadas anteriormente levando em consideração a mediana, se observa que os coeficientes de determinação para estas variáveis também foram maiores nas determinações analógicas do que nas digitais. Como aconteceu com a média os menores coeficientes foram encontrados na variável nitrogenase, como pode ser observado na Tabela 3, com coeficiente de determinação inferior a 0,70. Merece destaque que de modo geral comprimento e diâmetro foram mais significativos considerando a mediana do que a média, indicando que a mediana é mais indicada como medida de tendência central do que a média, nestas condições.

Analisando os resultados dos níveis de significância foram observadas diferenças entre as variáveis no método analógico na massa fresca de nódulos para comprimento e número de observações, massa seca de nódulos, massa seca da parte aérea e a massa seca de raiz para número de observações. A nitrogenase não apresentou diferença quando analisada levando em consideração esta metodologia (Tabela 3).

Para o método digital observa-se que ocorreu diferença entre as metodologias nas seguintes variáveis levando em consideração a média: massa fresca e seca de nódulos para comprimento, diâmetro e número de observações, para massa seca de nódulos não apresentou diferença, massa seca da parte aérea apresentou diferença para comprimento, diâmetro e número de observações, para a

massa seca da parte aérea e da raiz foram observadas diferença para número de observações. Já para a nitrogenase foi observada diferença quando analisada pelo método digital para comprimento e diâmetro.

Para as mesmas variáveis analisadas anteriormente levando em consideração a mediana observa-se que pelo nível de significância para massa fresca de nódulos foi observado diferença significativa para comprimento e diâmetro, para massa seca de nódulos apresentou diferença significativa no diâmetro, para massa seca da parte aérea foi observado diferença para comprimento, diâmetro, e número de observações, para massa seca da raiz para diâmetro e nitrogenase foi observado diferença para o diâmetro.

De modo geral 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 no modelo.

CONCLUSÕES

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, porém diferença significativa entre elas foi observada sendo, porém, de pequena magnitude. 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, comprimento e diâmetro dos nódulos determinados pela nova metodologia apresentaram-se como melhores preditores de várias variáveis de desempenho da planta do que pela medição convencional.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARRESE-IGOR, C.; GONZALEZ, E. M.; GORDON, A. J.; MINCHIN, F. R.; GALVEZ, L.; ROYUELA, M. Sucrose synthase and nodule nitrogen fixation under drought and other environmental stresses. **Symbiosis**, Rehovot, v. 27, p. 189-212, 1999.

BANGEL, E. V., MEYER, J. V., SILVA, G. M. Coleção de culturas de rizóbio SEMIA (FEPAGRO-MIRCEN). In: Congresso Brasileiro de Ciência do Solo, 28.,2001, Londrina. **Anais**: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, .p 68-68, 2001.

CORDOVILLA, M. D. P.; LIGERO, F.; LLUCH, C. Growth and nitrogen assimilation in nodules in response to nitrate levels in *Vicia faba* under salt stress. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 47, p. 203-210, 1996.

DATE, R. A. Inoculated legumes in cropping systems of the tropics. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 65, p. 123-136, 2000.

DELGADO, M. L.; LIGERO, F.; LLUCH, C. Effects of salt stress on growth and nitrogen fixation by pea, faba-bean, common bean and soybean plants. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 26, p. 371-376, 1994.

GRAHAM, P. H. Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 38, p. 475-484, 1992.

HARDY.R. W.F; BURNS, R.C; HOLSTEN, R.D. Applications of the acetylene assay for measurement of nitrogen fixation. **Soil Biology and Biochemistry**. 1973. Elmsford, v. 5 p. 47-81, 1973.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water-culture method for growing plants without soil**. Berkeley: California Agricultural Experiment Station, p 32, 1950.

HUNGRIA, M.; FRANCO, A. A. Effects of high temperature on nodulation and nitrogen fixation by *Phaseolus vulgaris* L. **Plant and Soil**, The Hague, v. 149, 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 Research**, Amsterdam, v. 65, p. 151-164, 2000.

LIRA JUNIOR, M. A.; SMITH, D. L. Use of a standard TWAIN scanner and software for nodule number determination on different legume species. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 32, p. 1463-1467, 2000.

LIRA JUNIOR, M. A.; COSTA, C.; SMITH, D. L. Effects of addition of flavonoid signals and environmental factors on nodulation and nodule development in the pea (*Pisum sativum*)–*Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* symbiosis. **Australian Journal of Soil Research**, Melbourne, v. 41, p. 267-276, 2003.

LIRA JUNIOR, M. A.; LIMA, A. S. T.; ARRUDA, J. R. F.; SMITH, D. L. Effect of root temperature on nodule development of bean, lentil and pea. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 37, p. 235-239, 2005.

MIRANDA, P., COSTA, A. F. DA, PIMENTEL, M. DE L., MAFRA, R. C., OLIVEIRA, L. R. Feijão comum "Princesa" (*Phaseolus vulgaris* L.). In: Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária. **Cultivares recomendadas pelo IPA**. Recife: Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária, p. 21-22, 2002.

MIGUEL, D. L.; MOREIRA, F. M. S. Influência do pH do meio de cultivo e da turfa no comportamento de estirpes de *Bradyrhizobium*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. Campinas, v. 25. p. 873-883, 2001. feijoeiro comum com rizóbio. **EMBRAPA-CNPBS**, N.10. P.1-8,1992

MONTEALEGRE, C.; GRAHAM, P. H.; KIPE-NOLT, J. A. Preference in the nodulation of *Phaseolus vulgaris* cultivar RAB39. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 41, p. 992-998, 1995.

MUNNS, D. N. Soil acidity and nodulation. **Mineral nutrition of legumes in tropical and subtropical soils**. v. East Melbourne, Victoria, CSIRO, Australia-263, 1992.

PAVAN, M.A.; BINGHAM, F.T.; PRATT, P.F. Toxicity of aluminium to coffee in Ultisols and Oxisols amended with CaCO₃ and CaSO₄. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 46, p. 1201-1207, 1982.

PANZIERI, M.; MARCHETTINI, N.; HALLAM, T. G. Importance of the *Bradyrhizobium japonicum* symbiosis for the sustainability of a soybean cultivation. **Ecological Modelling**, Amsterdam, v. 135, p. 301-310, 2000.

PHILLIPS, D. A. Using rhizobia in the 21st century. **Symbiosis**, Rehovot, v. 27, p. 83-102, 1999.

PIMENTEL-GOMES, F., GARCIA, C. H. **Estatística aplicada a experimentos agrônômicos e florestais**. Exposição com exemplos e orientações para uso de aplicativos. Piracicaba: FEALQ, p. 305, 2002.

RIBEIRO JÚNIOR, W. Q.; LOPES, E. S.; FRANCO, A. A. Eficiência de estirpes de *Bradyrhizobium* spp. Para quatro leguminosas arbóreas e competitividade das estirpes em *Albizia lebbek* em latossolo ácido. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. Campinas, v. 11. p. 275-282, 1987.

RITCHEY, K.D.; SILVA, S.E. COSTA, V.F. Calcium deficiency in clayey B horizons of savannah Oxisols. **Soil Science**, Baltimore, v.133 p. 378-382, 1982.

SAS INSTITUTE **The SAS System for Windows**. [S.l.:s.n.], 1999. CD-ROM.

SILVEIRA, J. A. G. D.; COSTA, R. C. L. D.; OLIVEIRA, J. T. A. Drought-induced effects and recovery of nitrate assimilation and nodule activity in cowpea plants inoculated with *Bradyrhizobium* spp. under moderate nitrate level. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 32, p. 187-194, 2001.

SCHOLLES, D.; KOLLING, J.; FREIRE, J. R. J. Necessidade de inoculação e aplicação de calcário em leguminosas forrageiras tropicais em solos ácidos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 5, p. 97-102, 1981.

CAPÍTULO 2

DESENVOLVIMENTO DE NÓDULOS E PLANTAS DE CAUPI DETERMINADO POR MÉTODOS DESTRUTIVO E NÃO DESTRUTIVO¹

Costa, J.V.T.²; Lira Junior, M. A.^{3,4}; Stamford, N.P.³; Ferreira, R. L. C.³;
Campanharo, M.⁵; Sousa, C.A.⁶; Araújo, F.A.S⁶.

RESUMO

A simbiose entre leguminosas e rizóbios é a fonte mais importante de nitrogênio fixado biologicamente em sistemas agrícolas. Neste sistema, a fixação biológica de nitrogênio (FBN) é um processo que ocorre nos nódulos das leguminosas e pode substituir os adubos nitrogenados, não depende de energia externa, e tem poucos efeitos ambientais potencialmente adversos. No entanto, plantas dependentes da FBN costumam apresentar efeitos mais severos para diversos estresses ambientais do que plantas recebendo fertilizante nitrogenado. Estes efeitos não são bem conhecidos, mas sabe-se que a nodulação e posterior desenvolvimento dos nódulos é um dos pontos críticos na FBN. A maior parte dos trabalhos estudando estas etapas tem dependido de métodos destrutivos, que não permitem que o pesquisador acompanhe uma mesma planta e aumentam o tamanho dos experimentos. Deste modo, este trabalho teve por objetivo avaliar procedimentos para acompanhamento

¹ Trabalho apresentado como parte da dissertação do primeiro autor junto ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo da UFRPE. Trabalho financiado por bolsa de Mestrado e auxílio de custo pela CAPES através do Programa PROF/UFRPE

² Engenheiro Agrônomo, MSc em Agronomia-Ciência do Solo. Correntemente aluno de doutorado no Programa de Pós - Graduação em Agronomia – Ciência do Solo da UFRPE. jvtcnovo@hotmail.com

³ Professor Adjunto da UFRPE. mliraj@ufrpe.br, rinaldof@ufrpe.br, newtonps@ufrpe.br

⁴ Autor para contato. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, Av. D. Manoel de Medeiros S/N. Dois Irmãos, Recife, PE. 52171-900. mliraj@ufrpe.br

⁵ Engenheira Agrônoma, Discente do Mestrado do Programa de Pós - Graduação em Agronomia - Ciência do Solo da UFRPE marcelaufrpe@yahoo.com.br

⁶ Discente de Agronomia, UFRPE. claytondesousa@hotmail.com, fasaraujo@hotmail.com

do desenvolvimento de nódulos por métodos destrutivo e não destrutivo em um mesmo conjunto de plantas. Foi conduzido um experimento com feijão caupi em casa de vegetação em que a partir dos sete dias após emergência e até a maturidade fisiológica das plantas foram realizadas determinações semanais de altura e área foliar, e digitalização de todos os sistemas radiculares. Semanalmente também foi retirada uma planta por bloco para determinações destrutivas das variáveis indicadoras do desenvolvimento da planta e da nodulação. Os nódulos tiveram área, comprimento e diâmetro determinados tanto nos retirados manualmente quanto naqueles que puderam ser observados nos lados mais extensos do vaso. Para área, comprimento e diâmetro dos nódulos foi realizada inicialmente análise descritiva a cada ponto, sendo calculadas, máxima, média, mediana, mínima e soma para cada característica. Estas e área foliar e altura da planta foram consideradas como variáveis dependentes e idade da planta como variável independente na análise de regressão. Regressões foram realizadas de forma independente para as medições obtidas pelo processo destrutivo, tradicional. Os resultados indicam boa concordância de modo geral entre as curvas de desenvolvimento obtidas pelos métodos destrutivo e não-destrutivo, em particular quanto à previsão de aparecimento de nódulos e idade em que a máxima produção para cada variável foi encontrada. Dentre as variáveis ligadas ao tamanho do nódulo, a soma do comprimento apresentou melhores características quando comparada à massa seca dos nódulos.

Palavras chave: análise de imagens, rhizobium, rizóbio, fixação de nitrogênio, FBN

ABSTRACT

The legume-rhizobia symbiosis is the most important source of biologically fixed nitrogen for agricultural systems. For this system biological nitrogen fixation (BNF) is a process which occurs at legume nodules, which substitute nitrogen fertilizer, does not depend on external energy sources and has few potential deleterious environmental effects. That notwithstanding, BNF dependent plants usually suffer stronger effects from various environmental stresses than plants receiving nitrogen fertilizer. These effects are not well understood, but it is known that nodulation and later nodule development are one of the critical points of BNF. Most studies of these aspects depend on destructive methods, which do not allow the researcher to follow

the same plant, and increase experiment size. This work was conducted to evaluate procedures for nodule development analysis through non-destructive and destructive methods at a same plant set. An experiment was conducted using cowpea at a greenhouse. Plants were weekly measured from seven days old to physiological maturity for plant height and leaf area, and all root systems were digitized. Weekly a plant was also collected from each block for destructive determination of plant and nodule development indicative variables. Nodules area, length and diameter were measured for those hand separated from the root system and for those visible on the vessels side. For nodule area, length and diameter initial descriptive analysis were conducted for maximum, minimum, average, median, and sum for each variable. These variables, leaf area and plant height were studied by regression analysis being considered the dependent variables with plant age as independent variable. Independent regressions were conducted for data obtained by the traditional, destructive methods. Results indicate good general concordance for development curves obtained by destructive and non-destructive methods, in special in regard to nodule appearance estimate and age for maximum value for each variable. For nodule size variables, length sum had the best characteristics when compared to nodule dry mass.

Key Words: image analysis, rizobia, rhizobium, nitrogen fixation, BNF

INTRODUÇÃO

A simbiose entre leguminosas e rizóbio é a fonte mais importante de nitrogênio fixado biologicamente em sistemas agrícolas (Graham & Vance, 2000). Como este é um processo biológico, não depende de energia externa, e tem poucos efeitos ambientais potencialmente adversos. Devido à grande importância da fixação biológica de nitrogênio, até um pequeno aumento na eficiência da simbiose quanto à fixação de nitrogênio teria um impacto importante no balanço global de nitrogênio além de um aumento na eficiência dos sistemas agrícolas que incluem as leguminosas (Phillips, 1991; Panzieri et al., 2000).

A fixação biológica de nitrogênio atmosférico (FBN) é um processo ecológico e economicamente vantajoso que pode substituir os onerosos adubos químicos nitrogenados. No Brasil o melhor exemplo de utilização deste processo é a cultura da soja, onde a adubação química nitrogenada é totalmente substituída pela utilização de inoculantes contendo bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, o que

representou uma economia para o país, de cerca de US\$ 2 bilhões ao ano (Lacerda et al., 2004), embora este processo também seja importante para outras leguminosas, tal como o caupi *Vigna unguiculata* (Hungria et al., 1997).

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.

Para melhor estudar este sistema biológico e sua interação com o meio é de fundamental importância conhecer melhor os nódulos e sua interação com a planta e o meio (Date, 2000). A maioria dos estudos conduzidos até o momento basearam-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 avaliados e comparados.

Recentemente trabalhos realizados com ervilha e outras espécies de leguminosas descreveram métodos baseados em análise de imagem que permitem medições não destrutivas de nódulos (Lira Junior & Smith, 2000; Lira Junior et al., 2003). No entanto, estes trabalhos utilizaram esta técnica em amostragem destrutiva como ferramenta para permitir a determinação do tamanho dos nódulos de forma mais acurada e sem a limitação de tempo inerente à determinação convencional.

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. Esta 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 efeito da acidez do solo, por exemplo, que afeta mais de 800 milhões de hectares na América Latina (Graham, 1992).

Deste modo, este trabalho teve por objetivo avaliar procedimentos para acompanhamento do desenvolvimento de nódulos e das plantas por métodos destrutivo e não destrutivo em um mesmo conjunto de plantas.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi conduzido um experimento com caupi cultivar IPA 206 (Miranda et al, 2002) em casa de vegetação da UFRPE, Recife, 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 (D-23) medindo 20x7x1cm para evitar perda do substrato de crescimento. Estes 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 crescidos em meio YM contendo 10^9 células de rizóbio para cada semente, como descrito por (Bangel et al., 2001). 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 até drenagem. A partir dos sete dias após a semeadura até os 70 dias após semeadura foi retirado um vaso de cada repetição a cada semana para obtenção de número de nódulos, tamanho (comprimento e diâmetro), massa fresca e seca dos nódulos, área foliar, massa seca da parte aérea, massa seca do sistema radicular e atividade da nitrogenase ($\text{nmol C}_2\text{H}_4 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{planta}$). Número de folhas e altura das plantas também foram determinadas não destrutivamente na mesma data, para todos os vasos restantes no experimento.

Os nódulos tiveram comprimento e diâmetro determinados (Lira Junior & Smith, 2000) tanto nos retirados manualmente por colheita quanto naqueles que puderam ser observados nas imagens obtidas pela digitalização dos lados mais extensos do vaso, na resolução de 300 pontos por polegada. A área foliar foi obtida mediante a digitalização das folhas em digitalizador segundo o mesmo procedimento utilizado para os nódulos. A média da área foliar específica (cm^2/folha) observada

em cada idade de amostragem foi utilizada para estimativa da área foliar das plantas remanescentes por multiplicação pelo número de folhas contadas.

O experimento foi conduzido no delineamento em blocos casualizados, sendo 10 colheitas e seis 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 de análise e seleção de modelos de regressão para as seguintes variáveis: número de nódulos, massa fresca e seca de nódulos e atividade da nitrogenase, altura da planta, área foliar, massa seca da parte aérea, da raiz e das vagens e massa fresca das vagens, considerando-se a idade das plantas como variável independente.

Para as variáveis área foliar e altura das plantas, a mesma análise foi realizada considerando as medições repetidas para cada planta, com 60 pontos para a idade de 7 dias e reduzindo seis plantas a cada semana devido à amostragem realizada.

Para área, comprimento e diâmetro dos nódulos foi realizada inicialmente análise descritiva a cada ponto, sendo calculadas, máxima, média, mediana, mínima e soma para cada característica. Estas foram consideradas como variáveis dependentes e idade da planta como variável independente, de forma semelhante a anteriormente descrita.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise destrutiva do desenvolvimento das plantas e da nodulação

Foram realizadas análises para obtenção da equação de regressão, coeficiente de determinação e coeficiente de variação para as variáveis de nodulação e as variáveis relacionadas com o desenvolvimento das plantas como podem ser observadas na Tabela 1.

Os resultados mostram que para o desenvolvimento das plantas os coeficientes de determinação e de variação apresentaram bons resultados em especial para massa seca da parte aérea, da raiz e de vagens, todas com R^2 acima de 0,90 embora massa fresca de vagens e área foliar tenham apresentado R^2 0,68 e 0,78 respectivamente. O aumento da massa seca da parte aérea e da raiz se deu até 63 dias aumentando progressivamente ao longo do ciclo da cultura. Foi

observada uma pequena redução na massa seca da parte aérea apenas aos 70 dias, correspondente a última data de colheita causada pela queda das folhas mais velhas em função da maturidade fisiológica das plantas.

A massa fresca de vagens foi determinada a partir de 56 dias após a emergência, com as vagens evoluindo em número e massa até os 70 dias. Para área foliar houve uma maior evolução até 35 dias após a emergência tendo aumento progressivo no número de folhas e conseqüentemente na área foliar. A partir dos 42 dias após a emergência houve diminuição no desenvolvimento da área foliar causada possivelmente pelo estágio de floração e posterior desenvolvimento de vagens. Conseqüentemente a massa seca da parte aérea foi influenciada pela redução no desenvolvimento que vinha apresentando até os 42 dias, como podem ser observadas as equações de regressão, os coeficientes de determinação e de variação e o máximo para estas variáveis na Tabela 1.

Tabela 1 – Equação de regressão, coeficiente de determinação (R^2), máximo e coeficiente de variação (CV) para cada variável, considerando a idade da planta como variável independente.

VARIÁVEIS	EQUAÇÃO	R^2	MÁXIMO	CV
N° nódulos	$10 (0,365 + 0,0735 \text{ idade} - 76 \times 10^{-5} \text{ idade}^2)$	0,7502	48 dias	11%
MF nódulos	$(-0,002 + 0,0427 \text{ idade} - 38 \times 10^{-5} \text{ idade}^2)^5$	0,9283	56 dias	8,0%
MS nódulos	$(0,0225 + 0,0323 \text{ idade} - 28 \times 10^{-5} \text{ idade}^2)^5$	0,8854	56 dias	10%
Nitrogenase	$10 (-1,445 + 0,0234 \text{ idade} - 15 \times 10^{-5} \text{ idade}^2)$	0,4934	Sem\ident	39%
MF vagens	$(-80,5 + 2,814 \text{ idade} - 0,023 \text{ idade}^2)^2$	0,6859	47 dias	26%
MS vagens	$(-37,11 + 1,215 \text{ idade} - 0,009 \text{ idade}^2)^2$	0,9378	Sem\ident	14%
Altura	$10 (0,555 + 0,0419 \text{ idade} - 27 \times 10^{-5} \text{ idade}^2)$	0,9200	Sem\ident	8,0%
MSR	$10 (-1,53 + 0,0491 \text{ idade} - 33 \times 10^{-5} \text{ idade}^2)$	0,9108	Sem\ident	35%
MSPA	$10 (-1,759 + 0,0902 \text{ idade} - 7 \times 10^{-4} \text{ idade}^2)$	0,9596	64 dias	32%
AF	$10 (2,057 + 0,025 \text{ idade} - 19 \times 10^{-5} \text{ idade}^2)$	0,7890	60 dias	19%

N° nódulos = número de nódulos, MF e MS nódulos = massa fresca e seca de nódulos, Nitrogenase, MF e MS vagens = massa fresca e seca de vagens, altura, MSR = massa seca da raiz, MSPA = massa seca da parte aérea, AF = área foliar. Sem\ident = sem identificação da data.

Com relação ao número de nódulos foi observado crescimento dos 7 dias após a emergência, fase inicial do processo de nodulação até a fase em que as plantas entraram em processo de formação de vagens, conseqüentemente os

nódulos mais velhos começaram a entrar em processo de senescência e em seguida decomposição, resultando na diminuição do número de nódulos a partir dos 56 dias.

A massa fresca e seca de nódulos apresentou evolução dos 7 dias após emergência até os 70 dias com coeficientes de determinação e de variação considerados muito bom para estas variáveis, com aumento de massa fresca e seca dos nódulos ao longo do tempo como pode ser observado na Tabela 1. Mesmo com a redução do número de nódulos a partir dos 56 dias, causado pelo processo natural de senescência, não foi percebida diminuição na massa seca de nódulos devido a nódulos formados tardiamente ainda estarem se desenvolvendo.

Para a altura das plantas os coeficientes de determinação e de variação também apresentaram resultados satisfatórios, sendo observado que a máxima altura identificada para as plantas foi identificada aos 70 dias após a emergência das plantas, coincidindo com a última colheita visto que a cultivar utilizada no experimento é de crescimento indeterminado. Foi obtida a maior massa seca de raiz aos 70 dias coincidindo com a mesma data em que foi obtida a máxima altura, apresentando coeficiente de variação de 35% para esta variável como pode ser observado na Tabela 1.

O valor máximo da massa seca da parte aérea foi encontrado aos 64 dias após emergência, fase em que as plantas apresentavam-se com todas as folhas totalmente formadas e desenvolvidas, esta variável apresentou coeficiente de determinação bom e coeficiente de variação de 32%. A área foliar teve sua área máxima identificada aos 60 dias com R^2 de 0,78 e CV de 19% como podem ser observados na Tabela 1.

Análise não-destrutiva do crescimento das plantas

Para altura determinada de forma não destrutiva os coeficientes de determinação e de variação determinados apresentaram resultados satisfatórios como podem ser observados na Tabela 2. Os resultados indicam que as plantas cresceram desde a emergência até a maturidade fisiológica, mesmo quando as plantas já estavam com vagens formadas, o que se deve a cultivar utilizada ser de crescimento indeterminado, concordando com os resultados apresentados pelo método destrutivo.

Tabela 2 – Equação de regressão, coeficiente de determinação (R^2), máximo para cada variável (máximo) e coeficiente de variação (CV) para altura de planta e área foliar determinados semanalmente.

VARIÁVEIS	EQUAÇÃO	R^2	Máximo	CV
Altura	$10^{0,784 + 0,0244 \text{ idade}}$	0,9193	70 dias	12%
Área foliar	$10^{1,328 + 0,0619 \text{ idade} - 52 \times 10^{-5} \text{ idade}^2}$	0,9567	58 dias	4,3%

A área foliar também apresentou resultados para o coeficiente de determinação e de variação muito bom para esta variável. As plantas apresentaram crescimento dos 7 dias após a emergência até os 58 dias, seguido por redução. A redução na área foliar foi causada pela queda das folhas mais velhas devido à maturidade fisiológica das plantas, como pode ser observado na Tabela 2.

Avaliação do desenvolvimento das plantas

Foram realizadas análises para obtenção das equações de regressão, coeficientes de determinação e coeficiente de variação para as variáveis relacionadas com a evolução da nodulação e desenvolvimento das plantas, como pode ser observado na Tabela 3.

Para as variáveis relacionadas com o comprimento os coeficientes de determinação (R^2) obtidos foram superiores a 0,86 com exceção da variável comprimento mínimo que apresentou (R^2) de 0,63. As idades em que os maiores tamanhos foram encontrados variaram de 52 a 66 dias após emergência, dependendo da variável considerada (soma a mediana). Já para o comprimento mínimo os resultados são identificados nos primeiros dias após a emergência, indicando que o mínimo para comprimento de nódulo é provavelmente determinado pela capacidade de reconhecimento do nódulo, concordando com Lira Junior et al, (2003) e Lira Junior et al, (2005). Percebe-se que todos os valores encontrados foram obtidos a partir dos 52 dias, fase em que todas as plantas já tinham atingido a maturidade fisiológica encontrando se totalmente desenvolvidas e conseqüentemente a maioria dos nódulos também já estavam formados. Os coeficientes de variação (CV), foram inferiores a 10%, considerados de boa

precisão. A exceção foi a variável comprimento mínimo que apresentou um (CV) de 37%, possivelmente pelas pequenas diferenças encontradas em função do tempo.

Tabela 3 – Equação de regressão considerando idade como variável independente, coeficiente de determinação (R^2), máximo para cada variável (máximo) e coeficiente de variação para as variáveis analisadas.

VARIÁVEIS	EQUAÇÃO	R^2	Máximo	CV
Comp máximo	$10^{(0,094 + 0,0323 \text{ idade} - 3 \times 10^{-4} \text{ idade}^2)}$	0,9271	54 dias	10%
Média comp	$(1,149 + 0,0367 \text{ idade} - 3 \times 10^{-4} \text{ idade}^2)^2$	0,9013	61 dias	6,5%
Mediana comp	$(1,16 + 0,0316 \text{ idade} - 24 \times 10^{-5} \text{ idade}^2)^2$	0,8667	66 dias	7,6%
Comp mínimo	$10^{(0,228 + 0,0004 \text{ idade} + 302 \times 10^{-7} \text{ idade}^2)}$	0,6320	7 dias	37%
Soma comp	$10^{(-0,274 + 0,101 \text{ idade} - 97 \times 10^{-5} \text{ idade}^2)}$	0,9539	52 dias	8,7%
Diam máximo	$10^{(0,0041 + 0,0345 \text{ idade} - 32 \times 10^{-5} \text{ idade}^2)}$	0,9229	54 dias	13%
Média diam	$(1,021 + 0,0337 \text{ idade} - 28 \times 10^{-5} \text{ idade}^2)^2$	0,9104	60 dias	6,3%
Mediana diam	$(0,939 + 0,0307 \text{ idade} - 24 \times 10^{-5} \text{ idade}^2)^2$	0,8858	64 dias	8,0%
Diam mínimo	$10^{(0,172 - 0,001 \text{ idade} + 56 \times 10^{-6} \text{ idade}^2)}$	0,6269	7 dias	42%
Soma diam	$10^{(-0,399 + 0,103 \text{ idade} - 0,001 \text{ idade}^2)}$	0,9487	51 dias	9,9%
Área máxima	$(1,464 + 0,0438 \text{ idade} - 38 \times 10^{-5} \text{ idade}^2)^2$	0,9395	58 dias	14%
Média área	$(2,031 + 0,0601 \text{ idade} - 46 \times 10^{-5} \text{ idade}^2)^2$	0,9369	65 dias	4,2%
Mediana área	$(1,880 + 0,0576 \text{ idade} - 42 \times 10^{-5} \text{ idade}^2)^2$	0,8973	69 dias	6,7%
Área mínima	$10^{(0,694 + 0,0015 \text{ idade} + 206 \times 10^{-7} \text{ idade}^2)}$	0,8855	7 dias	7,0%
Soma área	$10^{(0,182 + 0,102 \text{ idade} - 0,001 \text{ idade}^2)}$	0,6241	51 dias	12,7%
Número	$10^{(-0,422 + 0,0819 \text{ idade} - 81 \times 10^{-5} \text{ idade}^2)}$	0,9521	51 dias	6,9%

Comp = comprimento de nódulos, Diam = diâmetro de nódulos. O máximo foi calculado com base na equação

Para as variáveis relacionadas ao diâmetro dos nódulos os (R^2) encontrados estão todos acima de 0,88 com exceção da variável diâmetro mínimo que apresentou resultado inferior a 0,65 como já tinha sido observado para o comprimento. As idades em que os valores máximos foram encontrados em função da regressão coincidiram com os valores encontrados para o comprimento. A maior diferença encontrada para a idade de ocorrência do comprimento máximo e diâmetro foi de 2 dias, indicando que comprimento e diâmetro comportaram-se de modo semelhante ao longo do tempo. Também para o diâmetro mínimo o valor máximo foi identificado no início do desenvolvimento. Os coeficientes de variação

obtidos para o diâmetro foram inferiores a 13% para as variáveis, com exceção para o diâmetro mínimo que apresentou um (CV) de 42%.

A área dos nódulos comportou-se de forma semelhante ao comprimento e diâmetro, com valores máximos encontrados em datas aproximadamente equivalentes, com o máximo para a área mínima também sendo encontrada no início do desenvolvimento e com os coeficientes de variação para todas as variáveis abaixo de 14% como podem ser observados na Tabela 3.

Para o número de nódulos o máximo foi encontrado aos 51 dias apresentando coeficientes de determinação (R^2) acima de 0,93 e (CV) inferior a 7% para esta variável.

Comparação entre metodologia destrutiva e não destrutiva

Área foliar e altura das plantas apresentaram comportamento parecido independente da forma como foram determinados (análise destrutiva ou análise não destrutiva), apresentando uma relação direta de crescimento, ou seja, enquanto as plantas estão se desenvolvendo em altura, a área foliar também evoluiu junto, desde a emergência das plantas até a fase em que as folhas mais velhas começaram a cair pelo processo natural causado pela maturidade fisiológica das plantas, a partir de 58 dias. Observa-se que a data em que a área máxima obtida para área foliar difere entre os dois métodos em dois dias de uma metodologia para a outra, sendo aos 60 dias para o método destrutivo e aos 58 dias pelo método não destrutivo. Com relação à altura não foi observada diferença entre os métodos, sendo a altura máxima obtida aos 70 dias.

Na Figura 1A estão apresentadas as curvas de desenvolvimento da área foliar em função da idade para os métodos destrutivo e não destrutivo, sendo observado uma diferença acentuada entre as áreas foliares estimadas a partir dos 28 dias, mas de um modo geral elas identificam a evolução da área foliar ao longo do ciclo da cultura de forma semelhante, embora a metodologia não destrutiva exarcebe as características observadas pela metodologia destrutiva.

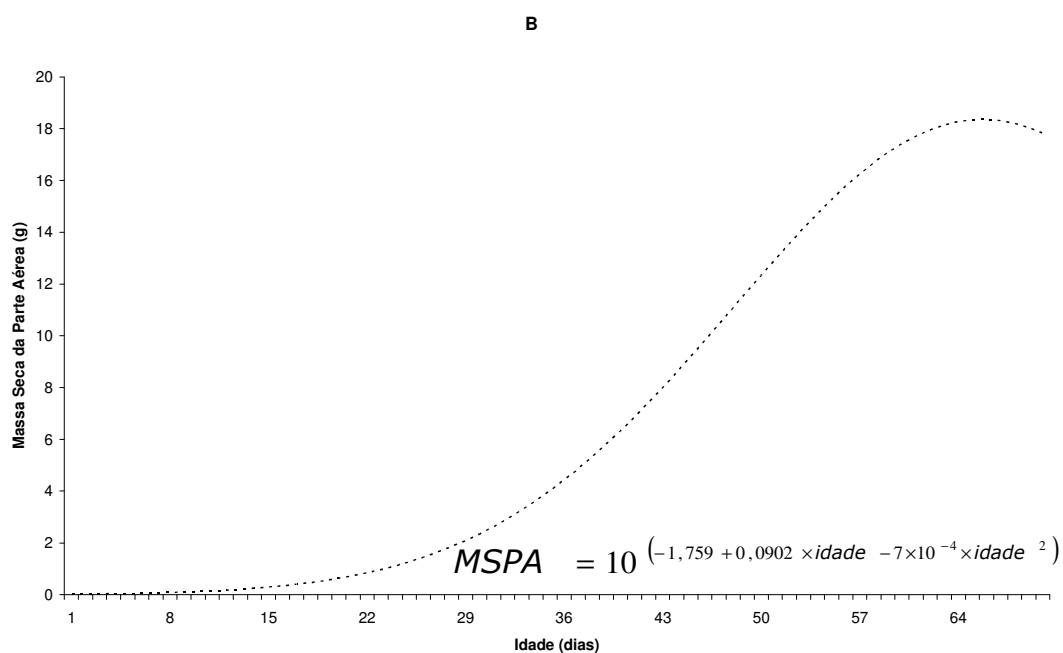
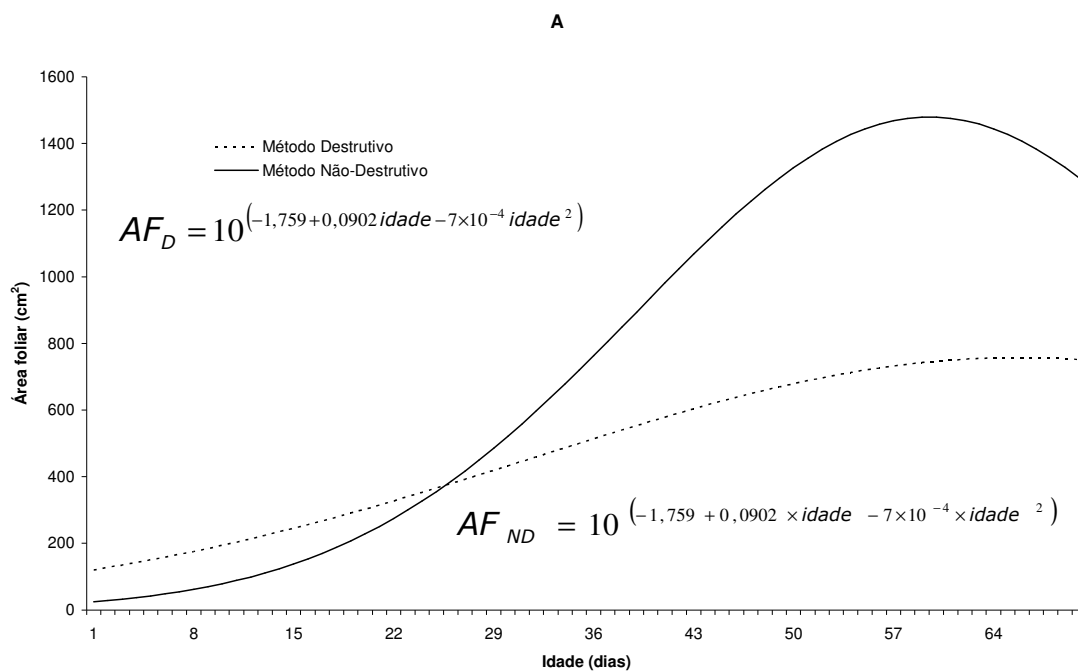


Figura 1. Comparação de métodos de avaliação de desenvolvimento de plantas de caupi cultivadas em casa de vegetação. A – Avaliação do desenvolvimento da área foliar por métodos destrutivo e não-destrutivo. B – Avaliação do desenvolvimento da massa seca da parte aérea.

Para a massa seca da parte aérea Figura 1B foi obtida uma curva de desenvolvimento muito semelhante à curva obtida pelo método não destrutivo para a área foliar.

A massa fresca e seca de nódulos como podem ser observadas na Tabela 1 atingiram o seu máximo aos 56 dias após a emergência das plantas. Já para o número de nódulos foi observada evolução desde o início da nodulação até atingir o seu máximo aos 48 dias e começando a apresentar redução a partir dos 56 dias.

Na Figura 2A estão apresentadas as curvas de desenvolvimento da nodulação para o método não destrutivo que superestima o número de nódulos durante parte do ciclo da cultura, o que não acontece com o método destrutivo. No geral as duas curvas são bem semelhantes com relação ao ponto em que começam a identificar a evolução da nodulação, a idade em que é atingido o pico máximo do número de nódulos e em seguida o declínio desse número ao longo do ciclo da cultura em cada data distinta.

Na Figura 2B podem ser observadas algumas variáveis como: soma, máximo, média e mediana que foram analisadas com a finalidade de identificar a que melhor descrevesse a evolução do comprimento dos nódulos individualmente e no seu conjunto ao longo do tempo. A soma dos comprimentos dos nódulos apresentou curva de desenvolvimento semelhante à obtida pelo método não destrutivo para número de nódulos, sendo também semelhantes à curva do desenvolvimento para massa seca de nódulos Figura 2C. Com esse resultado pode-se afirmar que esta variável é a que melhor representa o crescimento de nódulos analisados pelo método não destrutivo. A média e a mediana apresentaram curvas de formas bastante semelhante, mas suficientemente diferentes da curva obtida pelo método destrutivo para restringir sua aplicabilidade. Já a variável máximo, apresentou uma curva com pouca semelhança com a encontrada para as demais variáveis analisadas.

Na Figura 2C pode ser observado o desenvolvimento da massa seca de nódulos em função da idade, apresentando uma curva de desenvolvimento semelhante a que foi obtida para o método não destrutivo indicando que a evolução da massa seca de nódulos é melhor representada pelo método não destrutivo do que pelo método destrutivo.

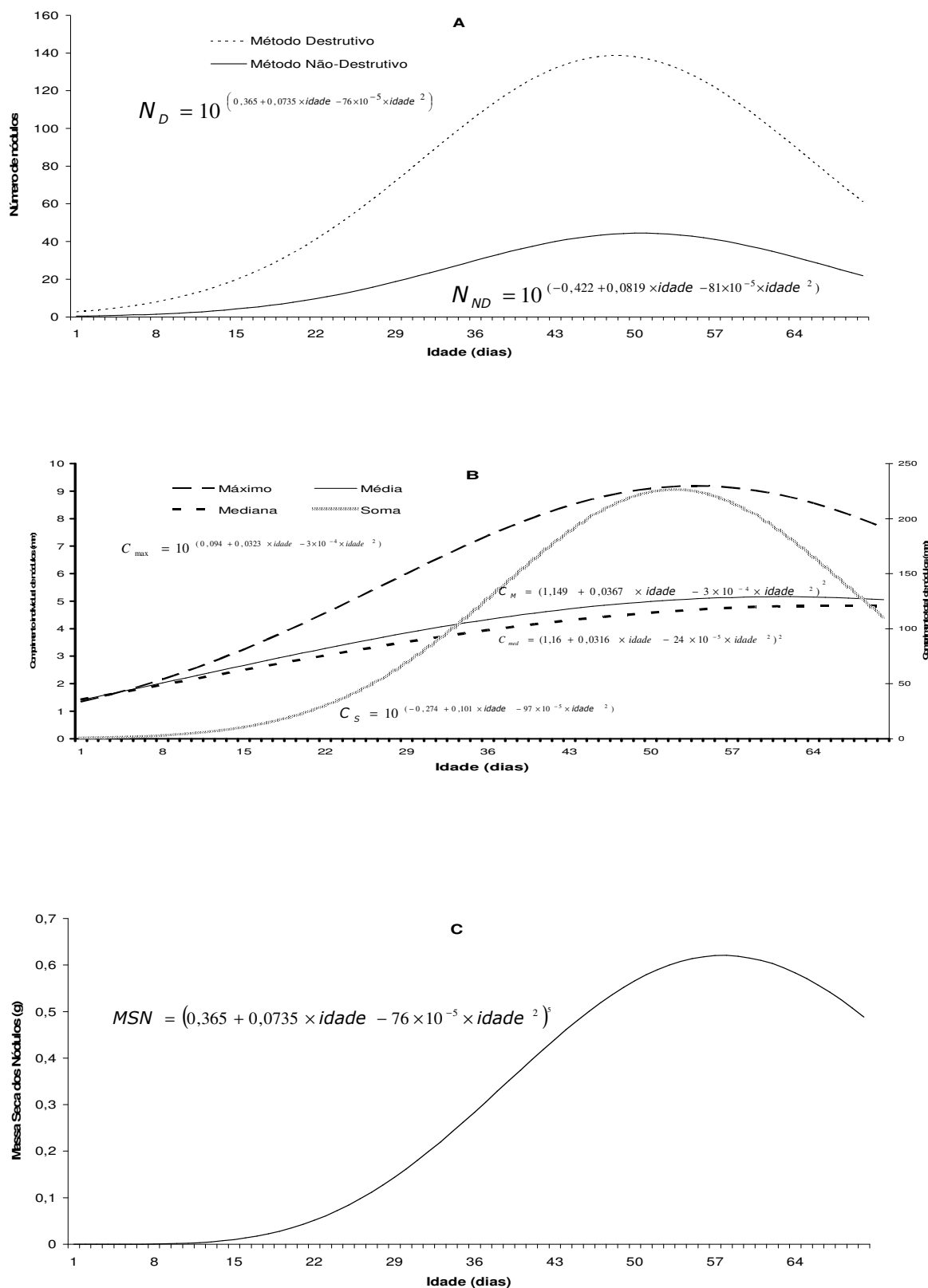


Figura 2. Comparação de métodos de avaliação de desenvolvimento de nódulos de caupi em plantas cultivadas em casa de vegetação. A – Avaliação do desenvolvimento do número de nódulos por métodos destrutivo e não-destrutivo. B – Avaliação do desenvolvimento de comprimento de nódulos por método não-destrutivo. C – Avaliação do desenvolvimento de massa seca de nódulos.

CONCLUSÕES

Os resultados indicam boa concordância de modo geral entre as curvas de desenvolvimento obtidas pelos métodos destrutivo e não-destrutivo, em particular quanto à previsão de aparecimento de nódulos e idade em que a máxima produção para cada variável foi encontrada.

O modelo para área foliar obtido pelo modelo não destrutivo representa de forma semelhante à curva de desenvolvimento observada para a massa seca da parte aérea.

Dentre as variáveis relacionadas ao tamanho dos nódulos, a soma do comprimento de nódulos apresentou melhores características quando comparada à massa seca dos nódulos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BANGEL, E. V., MEYER, J. V., SILVA, G. M. Coleção de culturas de rizóbio SEMIA (FEPAGRO-MIRCEN). In: Congresso Brasileiro de Ciência do Solo, 28. 2001, Londrina. **Anais**. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2001.p 68-68.

DATE, R. A. Inoculated legumes in cropping systems of the tropics. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 65, p. 123-136, 2000.

GRAHAM, P. H. Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 38, p. 475-484, 1992.

GRAHAM, P. H.; VANCE, C. P. Nitrogen fixation in perspective: an overview of research and extension needs. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 65, p. 93-106, 2000.

HOAGLAND, D. R., ARNON, D. I. **The water-culture method for growing plants without soil**. Berkeley: California Agricultural Experiment Station,. P. 32, 1950.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T. Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 65, p. 151-164, 2000.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T., ARAUJO, R. S. Biological nitrogen fixation by beans. In: **Biologia dos solos dos cerrados**. Brasília: EMBRAPA, 1997.

LACERDA; A.M.; MOREIRA, F.M.S.; ANDRADE, M.J.B.; SOARES, A.L.L.. Efeito de estirpes de rizóbio sobre a nodulação e produtividade do feijão - caupi. **Revista Ceres**. Viçosa, MG, v. 51, n 293 , p. 67-82, 2004.

LIRA JUNIOR, M. A.; SMITH, D. L. Use of a standard TWAIN scanner and software for nodule number determination on different legume species. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 32, p. 1463-1467, 2000.

LIRA JUNIOR, M. A.; COSTA, C.; SMITH, D. L. Effects of addition of flavonoid signals and environmental factors on nodulation and nodule development in the

pea (*Pisum sativum*)-*Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* symbiosis. **Australian Journal of Soil Research**, Melbourne, v. 41, p. 267-276, 2003.

LIRA JUNIOR, M. A.; LIMA, A. S. T.; ARRUDA, J. R. F.; SMITH, D. L. Effect of root temperature on nodule development of bean, lentil and pea. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 37, p. 235-239, 2005.

MIRANDA, P., COSTA, A. F. DA, RAPOSO, J. A. DE A., PIMENTEL, M. DE L., MAFRA, R. C., TAVARES, J. A., MARANHÃO, E. H. DE A., MARANHÃO, E. A. DE A. Feijão Macassar "IPA-205" (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). In: Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária. Cultivares recomendadas pelo IPA. Recife: Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária, p 23-24, 2002.

MONTEALEGRE, C.; GRAHAM, P. H.; KIPE-NOLT, J. A. Preference in the nodulation of *Phaseolus vulgaris* cultivar RAB39. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 41, p. 992-998, 1995.

MUNNS, D. N. Soil acidity and nodulation. **Mineral nutrition of legumes in tropical and subtropical soils**, v. East Melbourne, Victoria, CSIRO, Australia-263, 1992.

PANZIERI, M.; MARCHETTINI, N.; HALLAM, T. G. Importance of the *Bradhyrizobium japonicum* symbiosis for the sustainability of a soybean cultivation. **Ecological Modelling**, Amsterdam, v. 135, p. 301-310, 2000.

PHILLIPS, D. A. Genetic enhancement of nitrogen fixation. In: Dilworth, M. J., Glenn, A. R. **Biology and biochemistry of nitrogen fixation**. Amsterdam: Elsevier, p 408-428, 1991.

SAS INSTITUTE. **The SAS System for Windows**. [S.l.:s.n.], 1999. CD – ROM.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A estimativa obtida para o comprimento e diâmetro dos nódulos através da análise de imagens apresentou resultados que são satisfatórios, permitindo desta forma que os nódulos sejam analisados individualmente ao longo do ciclo da cultura sem que haja a necessidade da coleta das plantas para essa determinação.

Foram utilizadas três resoluções (100, 200 e 300 pontos por polegada) e destas a que apresentou os melhores resultados foi a de 300 pontos por polegada, sendo, portanto a mais indicada para ser utilizada em futuros trabalhos que tenham como finalidade estudar o processo da nodulação e os efeitos que interferem neste processo.

A mediana pode ser considerada como medida de tendência central preferível para comprimento e diâmetro dos nódulos determinados pela metodologia de análise de imagens, visto que se apresenta como melhor preditora de várias variáveis de desempenho da planta.

A metodologia desenvolvida apresenta resultados comparáveis à medição destrutiva dos nódulos, porém diferença significativa entre elas foi observada sendo, porém de pequena magnitude. Mesmo apresentando diferença é possível o uso da metodologia não destrutiva para determinação do comprimento e diâmetro de nódulos.

Dentre as variáveis ligadas ao tamanho dos nódulos, a soma do comprimento apresentou melhores características quando comparada à massa seca dos nódulos.

Os resultados indicam boa concordância de modo geral entre as curvas de desenvolvimento obtidas pelos métodos destrutivo e não-destrutivo, em particular quanto à previsão de aparecimento de nódulos e idade em que a máxima produção para cada variável foi encontrada.

No geral, os resultados indicam que a metodologia proposta apresenta potencial para uso na avaliação do efeito de estresses ambientais sobre a nodulação de leguminosas, mas testes devem ser executados em solo, para avaliar melhor a possibilidade de distinção dos nódulos, sendo sugerido também que as plantas fiquem mais próximas da parede do vaso, para melhor avaliação das etapas iniciais da nodulação.