

Capítulo 4

Análise de imagens para acompanhamento da nodulação em leguminosas

*Mario de Andrade Lira Junior
Rinaldo Luiz Caraciolo Ferreira
Karina Patrícia Vieira da Cunha
Márcia do Vale Barreto Figueiredo*

1. Introdução

1.1. Nodulação

A interação entre leguminosas e rizóbios é um exemplo de associação biológica intensamente estudada, cujos benefícios para a sustentabilidade agrícola são reconhecidos em virtude do processo de Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) (XAVIER et al., 2006). Esse processo ocorre em nódulos radiculares induzidos pela infecção bacteriana (URIBE, 1994). Os nódulos e a planta hospedeira são perfeitamente interligados por meio de vasos xilemáticos e floemáticos e totalmente integrados em termos hormonais e nutricionais. O processo da FBN requer um suprimento contínuo de carboidratos que fornecem tanto a energia para a redução do nitrogênio quanto os esqueletos de carbono necessários à assimilação da amônia produzida, sendo relativamente intensivo em energia produzida na parte aérea da planta hospedeira (SILVEIRA et al., 2003).

O estabelecimento bacteriano na rizosfera é uma condição fundamental para que o microrganismo possa interagir com a planta. Além disso, é necessário que a bactéria se espalhe ao longo da raiz e

não perca a capacidade de sobreviver e multiplicar-se de maneira competitiva em relação à comunidade nativa. A colonização radicular é um processo bastante complexo, pois diferentes microrganismos estão sujeitos a diversos fatores bióticos e abióticos (BENZRI et al., 2001; FIGUEIREDO et al., 2008). A sobrevivência do rizóbio e nodulação é frequentemente ligada com a competição por substratos de carbono, produção de antibióticos, sideróforos ou substâncias estimuladoras do crescimento vegetal (RUMJANEK et al., 1995). Os sideróforos desempenham um papel fundamental na formação do nódulo (REIGH; O'CONNELL, 1993). A capacidade de produzir sideróforos parece ser mais difundida entre o gênero *Rhizobium* do que entre o gênero *Bradyrhizobium*, que evoluiu em solos ácidos, nos quais Fe está, normalmente, mais disponível (GUERINOT, 1994). Além disso, os rizóbios podem utilizar sideróforos de outros rizóbios, o que é chamado de sinergismo interestirpe, desde que possuam proteínas receptoras da membrana externa específica para o sideróforo em questão.

1.2. Nódulos indeterminados e determinados

Dependendo do sistema simbiótico, podemos encontrar dois tipos de nódulos: indeterminados e determinados, em função de sua origem no córtex interno ou externo. Ambos apresentam estrutura anatômica distinta e diferem na forma em que se comportam a bactéria no interior do nódulo em formação, embora a indução do ciclo celular em ambos os sistemas siga a mesma regulação. Nos nódulos indeterminados, que ocorrem em plantas dos gêneros *Medicago*, *Pisum*, *Trifolium*, *Vicia*, entre outras, são as células do córtex interior que reintroduzem a bactéria no ciclo celular, além de possuírem um meristema permanente, que lhe outorga uma forma cilíndrica com simetria radial na organização dos tecidos. Tem-se então uma zona central, na qual o rizóbio se instala e realiza a FBN (FOUCHER; KONDOROSI, 2000). Nos nódulos determinados, que ocorrem em plantas dos gêneros *Phaseolus*, *Glycine*, *Vigna*, *Lotus*, entre outras, não há um meristema permanente. Assim, seu crescimento se baseia na expansão em vez da divisão celular, razão pela qual apresentam uma morfologia esférica em vez de cilíndrica (HIRSCH, 1992).

1.3. Agentes sinalizadores

Resultados de experimentos têm mostrado a possibilidade de se obter incremento na nodulação, por exemplo, por meio do fornecimento de sinais (flavonoides) que podem ser adicionados aos inoculantes. Diversos benefícios agronômicos, como aumento significativo da nodulação de leguminosas e da capacidade competitiva dos rizóbios, podem ser alcançados pelo aumento quantitativo e/ou qualitativo dos indutores pelo hospedeiro (ALMARAZ et al., 2007; LIRA JUNIOR et al., 2003; MABOOD et al., 2006a, 2006b; POUSTINI et al., 2005). Para tanto, torna-se crucial um melhor entendimento de trocas de sinais moleculares na interação planta-microrganismos (ANTÓN, 2004).

O processo de infecção pelo rizóbio envolve diferentes sinalizadores entre a planta e a bactéria (TAÍZ; ZIEGER, 2004). Timmers et al. (1999) relatam que a bactéria noduladora migra em direção às raízes em função de uma resposta quimioestática. Essa resposta é decorrente da atração pelos isoflavonoides e betaínas secretadas pelas raízes. Esses compostos ativam enzimas que induzem a transcrição de genes *nod*, que codificam moléculas sinalizadoras de oligossacarídeos de lipoquitina, identificados após a secreção por receptores, como lecitinas especiais produzidas nos pêlos radiculares.

Quando as células dos pêlos radiculares reconhecem os fatores de nodulação (Nod), inicia-se o enrolamento dos mesmos. Com a evolução da infecção é formado um canal dentro do pelo radicular, e enquanto no periciclo é iniciado o rearranjo do citoesqueleto microtubular, na parte interna do córtex ocorre a ativação das células que se dividem formando um primórdio. Posteriormente, ocorre a infecção, localizada distanciadamente da área radicular ativada. A ativação celular se estende progressivamente para o meio e para a parte mais externa do córtex, seguindo gradientes de diferenciação celular, o que resulta na formação de um primórdio nodular (FAGAN et al., 2007). Os fatores *nod* são responsáveis, em baixa concentração, pela síntese de proteínas, denominadas nodulinas, que desempenham papel importante na formação e manutenção do nódulo radicular (ALMARAZ et al., 2007).

Outro mecanismo de troca de sinal é a secreção de proteínas pelo rizóbio. Desses mecanismos, os mais comuns são os de secreção

tipo III, isto é, mecanismos de exportação de proteínas altamente conservados, em bactérias Gram negativas, que atravessam as membranas bacterianas, liberando as proteínas no citosol de células hospedeiras (SÜB et al., 2006). No caso rizobiano, recentemente, diversas proteínas têm sido identificadas como ligadas a esse sistema (SAAD et al., 2008). De modo geral, as funções dessas proteínas ainda não estão esclarecidas, visto que nem todas as estirpes apresentam esse sistema e que algumas mutações não afetam a nodulação enquanto outras têm efeitos deletérios (WASSEM et al., 2008).

Embora se conheça relativamente muito sobre genes dos rizóbios envolvidos na nodulação, pouco se sabe sobre os genes das leguminosas hospedeiras relacionados à simbiose. Nesse sentido, tem-se buscado identificar genes da planta envolvidos na nodulação (BUZAS; GRESSHOFF, 2007). Silverstein et al. (2006) encontraram novas famílias de genes em leguminosas, denominadas de proteínas ricas em glicina (GRP), prolina (PRP) e cisteína (CRP) que estão envolvidas, principalmente, na nodulação e proteção dos nódulos. Kuster et al. (2007) identificaram cerca de 100 genes das leguminosas que ativam diferentes estádios durante a simbiose com o rizóbio. Esses genes apresentam funções relacionadas à eficiência simbiótica, e entre elas a facilitação dos processos de transporte pelas membranas perissimbióticas, que cercam os bacteroides nos nódulos.

1.4. Avaliação da nodulação

Em razão das diferenças na habilidade nodulífera de leguminosas com estirpes nativas, a bioprospecção de rizóbios em solos locais pode fornecer subsídios sobre a eficiência da nodulação natural e da fixação de nitrogênio das espécies (SOUZA et al., 2007). Essas eficiências poderão ser avaliadas por meio de atividade da nitrogenase (HARDY et al., 1968); teor de ureídeos (HERRIDGE; PEOPLES, 1990); abundância natural ^{15}N (BODDEY et al., 2001); teor de leghemoglobina (WILSON; REISENAUER, 1963); número e tamanho de nódulos; nodulação específica (GAN et al., 2004), assim como por meio das nodulinas (proteínas sintetizadas pelos nódulos) (FARNDEN; ROBERTSON, 1980). Esses diversos métodos têm sido utilizados para avaliar eficiência e eficácia das estirpes (FARIA; FRANCO, 2002), visando, eventualmente, à recomendação de estirpes para o uso na

produção comercial de inoculantes. Uma característica comum da maioria desses métodos é ser baseado em métodos destrutivos, que não permitem, por exemplo, o acompanhamento de nódulos em uma mesma planta ao longo do tempo, como é possível por técnicas de análise de imagens (COSTA et al., 2006, 2007; LIRA JUNIOR et al., 2005), o que torna o desenvolvimento e aprimoramento dessas técnicas de grande valia.

2. Análise de imagens

Por muito tempo, as imagens foram utilizadas para simples documentação, descrição qualitativa e ilustração dos fenômenos observados pelos cientistas. Com o avanço tecnológico e a redução dos custos dos computadores, foram desenvolvidos sistemas de análise de imagem que representam, atualmente, um ponto de apoio a diversas áreas de estudo, como conservação de recursos naturais, manejo do solo e meteorologia; análises biomédicas, metalográficas e de anatomia vegetal (BOUMA et al., 2000; BRITO et al., 2004; COSTA et al., 2001; LIRA JUNIOR; SMITH, 2000; TEIXEIRA et al., 2006; VIEIRA JUNIOR et al., 2006). Algumas das maiores vantagens dessa análise estão na capacidade de diminuir a subjetividade da análise humana, de superar inconvenientes de análises manuais que são muitas vezes demoradas (BOUMA et al., 2000) e de permitir o armazenamento rápido das imagens antes da análise, seguido pelo processamento posterior em que o tempo pode ser menos limitante.

A análise de imagens tem como objetivo principal extrair informações úteis e relevantes para uma dada aplicação, expressando quantitativamente características específicas de objetos ou cenas de interesse dentro de uma imagem (VIEIRA JUNIOR et al., 2006). Essa possibilidade deve-se ao fato de as imagens digitais serem expressas como uma função matemática, após a digitalização de imagens contínuas (DOUGHERTY, 1994). As imagens digitais consistem em uma estrutura quadriculada formada por matrizes de números inteiros, e cada elemento dessas matrizes é composto por um pixel (*picture element*).

A partir da matriz de pixels da imagem, diversos tipos de processamento podem ser implementados por algoritmos computacionais, que são a base para a análise de imagens digitais, caracterizada pelo

arquivamento de dados e/ou comparação de padrões (TEIXEIRA et al., 2006).

Um sistema de análise de imagem é constituído de diversas etapas que variam de acordo com seu objetivo imediato (Figura 1). A etapa de aquisição engloba a formação da imagem e sua digitalização, fornecendo como saída uma imagem digital. O processamento digital de imagem (PDI) consiste na etapa de pré-processamento, enquanto a análise digital de imagem (ADI) compreende etapas de segmentação, pós-processamento, extração de atributos, reconhecimento e classificação. No pré-processamento e na segmentação, opera-se sobre os pixels da imagem. No pós-processamento e na extração de atributos, os objetos são modificados e, em seguida, medidos. Na etapa de reconhecimento e classificação, são analisados

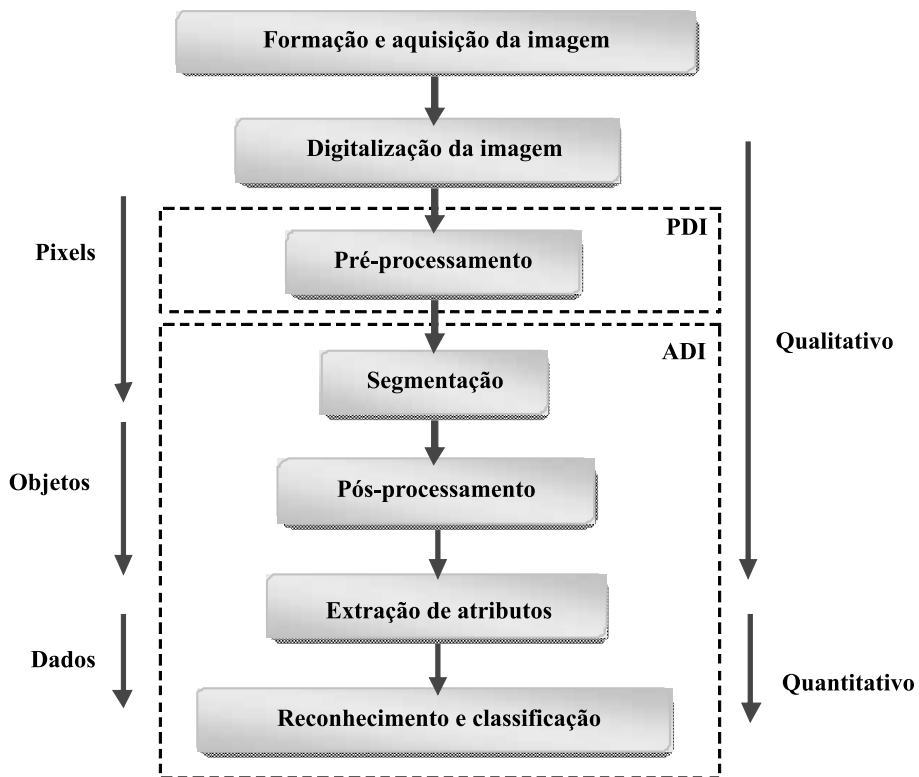


Figura 1. Etapas típicas de um sistema de processamento digital de imagens. Fonte: adaptado de Albuquerque et al. (2005).

os resultados das medidas, ou seja, os dados quantitativos. Geralmente, o termo Análise de Imagens usado na literatura engloba as etapas de aquisição, processamento e análise digital de imagem propriamente dita (DOUGHERTY, 1994).

Vale salientar que essas etapas não representam uma sequência obrigatória nesse processo, visto que há casos em que as imagens são capturadas, e nenhum tratamento é necessário. No entanto, em outros casos, a aplicação de técnicas refinadas de segmentação e filtragem é necessária para melhorar o desempenho do sistema de análise de imagem.

A aquisição e o pré-processamento de imagens são considerados etapas fundamentais para o sucesso dessa análise. Nessas etapas, as imagens podem ser capturadas e digitalizadas, compactadas, armazenadas e preparadas para as etapas posteriores. No processo de aquisição das imagens, são utilizadas as técnicas de projeção, digitalização ou tomografia, devendo ser adotados protocolos padrões e considerado o número de amostras necessárias à validação estatística dos dados ao final do processo (BOUMA et al., 2000). O pré-processamento é a etapa que intenciona melhorar a imagem, corrigindo defeitos oriundos da aquisição e realçando detalhes de interesse, de modo a facilitar sua visualização e prosseguir com as demais etapas de processamentos necessárias. Assim, antes de se trabalhar com uma imagem, faz-se necessário um processo de filtragem, que varre a imagem, procurando as transições entre fases e virtualmente decidindo a qual fase (por exemplo, objeto ou fundo) os pixels pertencem (ALBUQUERQUE et al., 2005).

Em sistemas de análise de imagens, é muito importante a subdivisão da imagem em suas partes constituintes ou objetos, técnica conhecida como segmentação (SENA JÚNIOR et al., 2004). Essas regiões ou objetos dentro da imagem são separadas ou segmentadas a partir de características como forma, geometria, topologia, textura, cor ou brilho, sendo escolhidas aquelas que possibilitem melhor distinção entre o objeto e o restante da imagem, ou seja, o fundo (VIEIRA JUNIOR et al., 2006). Após a segmentação, tamanho, cor, forma, posição, número e textura dos objetos são algumas das propriedades que podem ser quantificadas, representando a etapa de extração de atributos (DOUGHERTY, 1994). A partir dessa etapa, os objetos são reconhecidos e classificados para posterior análise e

interpretação dos dados. A etapa final de um sistema de processamento de imagens é aquela em que se extraem as informações úteis da imagem processada. Quando o objetivo do processamento é obter informações numéricas, realiza-se a extração de atributos da imagem.

Como exemplo do processo de análise de imagens, temos o estudo de raízes. De maneira geral, a avaliação de raízes tem sido efetuada de duas formas: diretamente no perfil de solo ou por meio de raízes lavadas. Embora, para raízes lavadas, a segmentação seja bastante simples, a aquisição dessas imagens tem se mostrado como um ponto importante e, dependendo do caso, limitante para a utilização dessa técnica. Em geral, pode-se melhorar a imagem adquirida, devendo-se apenas efetuar a eliminação de sombras provenientes da aquisição, mas não acrescentar informação à mesma. Além disso, os resultados encontrados na análise de imagens digitais dependem diretamente da informação contida na imagem. Levar em conta os cuidados na aquisição de uma imagem facilita os processos de identificação de objetos e texturas e a segmentação da mesma (JORGE; CRESTANA, 1996).

Em geral, as imagens de raízes lavadas são digitalizadas em tons de cinza, e a fim de facilitar a etapa de segmentação, são usuais correções de iluminação e usos de corantes que evidenciam áreas de interesse a serem analisadas, durante a aquisição das imagens. O uso de corantes é muito comum em técnicas de microscopia para diferenciar estruturas celulares; corante pode ser utilizado também para melhorar a visualização de raízes finas durante o escaneamento para cálculo de comprimento, diâmetro médio, número de nódulo nas raízes (BOUMA et al., 2000; COSTA et al., 2001; SMIT et al., 1994). Bouma et al. (2000) sugerem que as raízes finas sejam coradas para melhorar o contraste com o fundo e evitar a subestimação dos valores de comprimento e diâmetro médio das raízes. Esse tratamento, no entanto, pode dificultar a comparação entre dados encontrados na literatura, uma vez que períodos de colorações diferentes são usados. A dificuldade de padronização desse protocolo é muitas vezes justificada pela diferença entre sistemas radiculares apresentados pelas espécies. Porém, colorações em períodos bem definidos e concentrações fixas de corantes são essenciais para produção de resultados confiáveis e reprodutíveis (BOUMA et al., 2000). É importante salientar que as técnicas de coloração não são indicadas caso as raízes necessitem ser submetidas a análises futuras, como determinações

bioquímicas e digestão do tecido vegetal, para obtenção de teores de nutrientes e metais pesados acumulados. Nesse caso, os autores recomendam o aumento da resolução de digitalização e redução da densidade de distribuição de raízes sob o scanner, que além de melhorar a visualização de estruturas finas, reduz problemas de sobreposição e de sombreamento que pode subestimar e superestimar, respectivamente, os resultados obtidos. Outra técnica, sugerida por Teixeira et al. (2006), é o não fechamento da tampa do scanner e a não iluminação diretamente sobre o aparelho durante o procedimento de digitalização, o que produz o efeito de fundo desejado para a formação das imagens com o preto como cor predominante e as raízes em níveis de cinza, melhorando o contraste na imagem e a detecção do comprimento e diâmetro das raízes.

Para análise de imagens de raízes em perfis de solo, a presença de solo, palha e outros detritos podem dificultar o processo de segmentação, principalmente, porque essas imagens geralmente são coloridas. A aquisição da imagem a partir do perfil requer cuidados que vão desde a abertura da trincheira, preparo do perfil, filmagem, até digitalização (JORGE; CRESTANA, 1996), e em alguns casos pode depender também do operador do sistema.

Um dos maiores desafios para utilização de análise de imagem em campo é o controle da luminosidade. De fato, no campo, a iluminação não é controlada, e as variações na cor da luz durante o dia e as épocas do ano provocam alterações nas cores dos objetos nas imagens capturadas (SENA JÚNIOR et al., 2004). Na análise de imagem, a intensidade luminosa é um fator muito importante. Ela influencia diretamente nos valores numéricos dos pixels em uma imagem digital, uma vez que esses valores representam a energia refletida pelos objetos e que será captada pelo sensor da câmera.

Para a captura de imagens no campo, é frequente o uso de suportes verticais que centralizam a câmera sobre as parcelas e evitam a interferência subjetiva de fotógrafos (BEHRENS; DIEPENBROCK, 2006). Esses estudos usam, na maioria das vezes, o atributo cor como fator discriminatório para identificação e segmentação dos objetos dentro das imagens capturadas no campo. De maneira geral, os sistemas de representação de cor mais adequados para se obter resultados significativos no processo de segmentação dessas imagens são aqueles cujos componentes mostram-se menos correlacionados

(LALIBERTE et al., 2007; LANA et al., 2006). O sistema de cores RGB (vermelho, verde e azul), que apresenta facilidades para a computação da informação cor, tem o inconveniente de possuir componentes altamente correlacionadas, responsáveis, na maioria das vezes, pela segmentação impura da imagem (LANA et al., 2006). Nesses casos, durante a segmentação, tem sido considerado mais adequado o sistema de cores HSI em virtude da baixa correlação de suas componentes matiz (H), saturação (S) e intensidade (I). Nesse modelo HSI, é fácil a eliminação de um dos componentes, como a intensidade (I), deixando assim a segmentação menos sensível às mudanças de iluminação (LALIBERTE et al., 2007).

É possível notar que diferentes técnicas de análise de imagem encontradas na literatura consistem em variações ou adaptações das etapas gerais de processamento digital de imagem, testadas a fim de se obter técnicas mais precisas e com maior aplicabilidade para a determinada área de estudo. Com o avanço da tecnologia computacional, métodos tradicionais têm sido substituídos por técnicas sofisticadas para obtenção e análise de dados. Nesse aspecto, os sistemas de análise de imagens se destacam no melhoramento de imagens ou na medição e análise de grandezas relevantes e como uma das áreas de maior desenvolvimento e significância na resolução de diversos problemas nos respectivos campos de estudo.

Uma motivação para o desenvolvimento e aprimoramento de técnicas de análise de imagens aplicadas a estudos da interação planta-ambiente é a possibilidade de se obter informações complementares às técnicas experimentais convencionais, de tempo e custos muito elevados, permitindo o desenvolvimento de ferramentas mais precisas, rápidas e de custo reduzido. Um dos mecanismos para redução de custo experimental permitido pela análise de imagens é o acompanhamento do sistema radicular de uma mesma planta, pela substituição de métodos mais convencionais de análise destrutiva. Essas medições, ao serem repetidas em uma mesma planta, necessitam de técnicas adequadas para análise de dados.

3. Medições repetidas

Em várias áreas das ciências agrárias, tais como Agronomia, Engenharia Florestal, Zootecnia, entre outras, é bastante frequente a

utilização de experimentos denominados de medidas repetidas no tempo. Nesse tipo de experimento, o objetivo principal é comparar as tendências dos tratamentos ao longo do tempo, ou seja, se os perfis dos tratamentos são horizontais e se são paralelos entre si (MALHEIROS, 2004).

O uso da análise de medidas repetidas exige a definição de pelo menos um fator intraindivíduos, o qual vai indicar as variáveis que contêm as medidas repetidas (NEMEC, 1996). Esse tipo de análise geralmente tem sido abordada como um experimento fatorial, em que o tratamento e o tempo são os dois fatores (VILLALOBOS et al., 2007).

Na análise de variância desses experimentos, devemos considerar que as observações são feitas em uma mesma unidade experimental e são naturalmente correlacionadas, visto que a situação no tempo $t+1$ de uma dada unidade experimental terá sido naturalmente afetada pela situação no tempo t . Conforme a estrutura da matriz de covariância das observações, essa análise pode ser realizada considerando um modelo univariado, multivariado ou misto.

Uma consequência imediata de se ignorarem diferentes correlações entre dados mensurados no tempo é que a significância aparente da diferença entre as médias dos tratamentos é grosseiramente exagerada, e a sensibilidade dos testes para interação é seriamente reduzida (CECON et al., 2008).

Assim, a análise univariada só deve ser adotada quando são atendidas suposições sobre a estrutura de covariância das observações. Nesse caso, a análise é baseada no número total de observações, ou seja, as medidas são tratadas separadamente, sendo o tempo incluído como um fator no modelo Anova (NEMEC, 1996).

No caso de se adotar uma técnica multivariada, as suposições sobre a estrutura de correlação das observações de um mesmo indivíduo não são rígidas. A análise é baseada no número total de unidades experimentais.

No entanto, tanto na análise univariada e na multivariada requer-se que as variâncias e as correlações sejam homogêneas, o que as diferenciam da análise mista, na qual a estrutura da matriz de covariâncias pode ser modelada da forma que melhor represente os dados, ou seja, pode levar em consideração se os dados são independentes,

dependentes, correlacionados ou ainda apresentar outra relação que a matriz de covariâncias usual não consegue explicar (XAVIER; DIAS, 2001).

Segundo Villalobos et al. (2007), o procedimento mais simples para esse tipo de experimento é o de parcelas subdivididas, na qual a parcela principal é a unidade experimental, e as subparcelas são formadas pelo tempo. No entanto, Malheiros (2004) afirmou que isso nem sempre é correto, pois esse esquema pressupõe que a matriz de covariâncias (Σ) tenha uma estrutura homogênea, que nem sempre se verifica. Para que esse procedimento seja válido, requer-se a condição de Huynh-Feldt (HUYNH; FELDT, 1970), ou seja, que as medições tenham a mesma variância em todos os períodos, e a correlação entre duas medições sucessivas ou separadas no tempo sobre um mesmo indivíduo ou objeto seja igual.

A condição de Huynh-Feldt (H-F) é necessária e suficiente para que o teste F da análise de variância usual, no esquema de parcelas subdivididas no tempo, seja válido. Quando a condição H-F é atendida, pode-se afirmar que a variável aleatória é igualmente correlacionada e tem variâncias iguais, considerando as diferentes ocasiões. A matriz de covariância com essas características tem uma forma chamada de simetria composta e atende a condição para que o teste F seja válido, em nível de subparcelas, para o fator tempo e interação tempo x tratamento.

Fernández (1991) também ressaltou que, ao se considerar um esquema de parcelas subdivididas, os níveis do tempo não podem ser aleatorizados para seus intervalos, pois a análise de variância usual pode não ser válida. Isso porque, com a falta de aleatorização, os erros correspondentes às respectivas unidades experimentais podem ter uma matriz de covariâncias que não possua variâncias homogêneas, acarretando, assim, um inflacionamento na probabilidade de rejeitar a hipótese nula quando ela corresponde à verdade (probabilidade do erro de tipo I).

Cole e Grizzle (1966), considerando que as observações obtidas nos experimentos de medidas repetidas estão correlacionadas e, portanto, são essencialmente de natureza multivariada, sugeriram que o método adequado para analisar esses experimentos é o procedimento multivariado, pois permite uma matriz de covariância com qualquer estrutura.

Vale salientar que antes dos procedimentos multivariados serem bem compreendidos, diversas aproximações foram introduzidas para compensar as violações (BOX, 1954a, 1954b; GEISSER; GREENHOUSE, 1958; HUYNH; FELDT, 1976), e essas técnicas são ainda amplamente utilizadas. No entanto, quando os dados são balanceados, a utilização de métodos multivariados é mais adequada considerando que ignora a presunção da existência de simetria e de esfericidade.

Para se verificar se a matriz de covariâncias atende a condição de H-F, Mauchly (1940) propôs um teste chamado teste de esfericidade, que verifica se uma população multivariada apresenta variâncias iguais e correlações nulas.

Fernández (1991) sugeriu as seguintes observações: a) se a condição de H-F para a matriz de covariâncias for satisfeita (teste de esfericidade não significativo), o teste univariado pode ser utilizado; b) se o teste de esfericidade apresentar entre 0,05 e 0,01 de significância, poderão ser utilizados a correção para os números de graus de liberdade ou os testes multivariados; e c) se a condição de H-F para a matriz de covariâncias for rejeitada, com um nível de significância menor que 0,01, somente testes multivariados deverão ser utilizados.

Segundo Vallejo e Lozano (2006), quando a suposição de esfericidade é satisfeita, a análise de variância univariada pode ser empregada. Caso contrário, se as matrizes de covariância são homogêneas, pode-se optar por um enfoque univariado com os graus de liberdade corrigidos mediante algum dos métodos existentes ou utilizar uma análise de variância multivariada. No entanto, ambos os enfoques são inválidos quando as matrizes são heterogêneas, especialmente quando os dados não têm distribuição normal e estão desbalanceados.

Xavier e Dias (2001) afirmaram que uma técnica alternativa aos modelos uni e multivariado seria a análise com modelos mistos que são uma extensão do modelo linear geral. Esses modelos englobam análise de curvas de crescimento, ou curvas polinomiais, que levam em conta a estrutura da matriz de covariâncias que melhor explica o comportamento das observações, tendo a vantagem de ajustar modelos que reduzem o número de parâmetros.

Um ponto importante nesse procedimento de análise é a escolha do modelo de covariância mais adequado para os dados, tendo

em vista a existência de literalmente dezenas deles. O procedimento mais comumente recomendado é essencialmente um processo de tentativa e erro, em que o modelo é ajustado, determinando, por exemplo, medidas de informação como AIC, e, após o ajuste de todos os modelos avaliados, o que apresentou os melhores valores para AIC é adotado (LITTELL et al., 1998, 2000; MILLIKEN, 2003; SAS INSTITUTE, 2006; WOLFINGER; CHANG, 2006). Esse procedimento é repetido para cada variável sob análise.

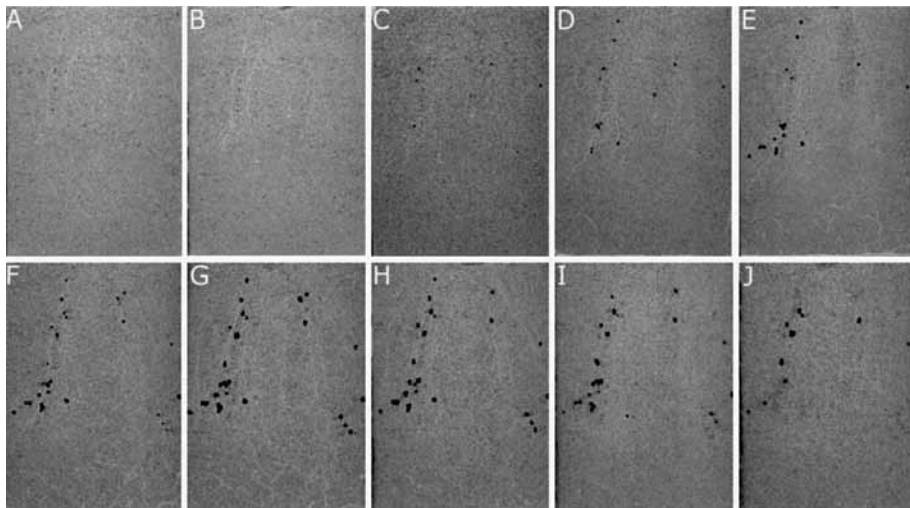
4. Emprego de análise de imagens no estudo da nodulação

A literatura indica, até o momento, três aplicações principais da análise de imagens em estudos de nodulação. Uma das aplicações é a avaliação de características micromorfológicas dos nódulos ou pelos radiculares, em que plantas são submetidas a determinados tratamentos, e, após processamento adequado do tecido, o que é dependente do estudo, as imagens obtidas são avaliadas, qualitativa ou quantitativamente (CHOVANEC et al., 2008; DAZZO et al., 1990; EHRHARDT et al., 1996; VIKMAN; VESSEY, 1993). Na segunda aplicação, a análise de imagem é utilizada para permitir a obtenção de medidas de tamanho de nódulos, que normalmente não seriam utilizadas em razão do esforço necessário, em particular considerando a rápida degradação do tecido nodular (LIRA JUNIOR et al., 2003). Essa variável pouco habitual é baseada em trabalhos bastante antigos que indicam relação entre eficiência de fixação e tamanho do nódulo (DÖBEREINER, 1966; DÖBEREINER et al., 1966), tendo sido confirmado em publicação recente que encontrou alta correlação entre tamanho do nódulo e matéria seca de nódulos, tanto para determinação por paquímetro ($r = 0,97$), quanto para determinação em uma imagem obtida sem a eliminação da planta ($r = 0,89$) (COSTA et al., 2007). O terceiro grupo de aplicações incluiria estudos em que medições destrutivas são, ao menos parcialmente, substituídas por medições não destrutivas da nodulação (ARAÚJO et al., 2005; CAMPANHARO, 2006; COSTA et al., 2005; LIRA JUNIOR et al., 2005; SOUSA et al., 2005; TAVARES, 2008).

Uma dificuldade comum é que geralmente nas medições não destrutivas a determinação do que é o nódulo é efetuada pelo

operador do sistema, sendo frequentemente bastante difícil, em razão da semelhança entre as características visuais do nódulo e seu fundo visual, bem como, ocasionalmente, entre nódulos de um mesmo agrupamento. Por outro lado, o desenvolvimento dos nódulos, ao longo do tempo, é bastante claro, como pode ser observado na Figura 2.

Uma grande possibilidade desse tipo de estudo não destrutivo é avaliar o efeito de estresses ambientais sobre a nodulação, como indicado por alguns trabalhos realizados pelo grupo de pesquisa sob a coordenação de um dos autores do capítulo (CAMPANHARO, 2006; LIRA JUNIOR et al., 2005; TAVARES, 2008). Enquanto um dos trabalhos foi realizado em hidroponia (LIRA JUNIOR et al., 2005), utilizando sacos plásticos para crescimento de plantas, os demais foram efetuados utilizando vasos de acrílico, dimensionados para representar aproximadamente o espaço ocupado por uma planta de feijão em uma linha de plantio, admitindo o espaçamento recomendado para a cultura (COSTA, 2005), com a maior dimensão representando o perfil do



Fotos: Mário de Andrade Lira Junior

Figura 2. Desenvolvimento do sistema radicular e da nodulação de caupi (*Vigna unguiculata*) dos 7 aos 70 dias após a emergência. Dias após a emergência (A) 7, (B) 14, (C) 21, (D) 28, (E) 35, F (42), G (49), H (56), I (63), J (70). Pontos em destaque indicam a presença e o tamanho dos nódulos visíveis.

Fonte: Costa et al. (2007).

solo, limitado pelo tamanho dos digitalizadores mais comuns no mercado.

A grande vantagem desse sistema é que, ao permitir o acompanhamento de uma mesma planta ao longo do tempo, reduz o número de parcelas necessário para avaliar cada tratamento. Como exemplo, admitiremos que queiramos avaliar o efeito de 5 doses de fósforo na nodulação de 2 variedades de feijão, e que serão utilizadas 4 repetições. Assim, temos que em um experimento mais convencional normalmente seriam adotadas 2 idades de amostragem, no florescimento e na colheita final, totalizando 80 vasos (5x2x4x2), mas sem condição de avaliar o efeito desses tratamentos ao longo do tempo, que frequentemente ajuda a entender o resultado final. Se utilizarmos essa técnica de análise de imagem, com um vaso transparente, com os mesmos 80 vasos, nós poderíamos observar o desenvolvimento do sistema radicular e dos nódulos a qualquer intervalo desejado.

Evidentemente, não é possível ter ganhos sem custos. Nesse caso, embora os vasos sejam comparativamente caros, eles têm demonstrado durabilidade suficiente para que o aumento de custo financeiro seja relativamente baixo. No caso particular do nosso grupo de pesquisa, os vasos têm demonstrado, além de alta durabilidade, baixo índice de perdas e a possibilidade de serem reaproveitados, como exemplo das três dissertações do nosso grupo. Assim, o principal aumento de custo é no nível de trabalho durante e depois do experimento. Tipicamente, utilizando a resolução que tem apresentado melhores resultados, 200 pontos por polegada, para a obtenção das imagens a partir da digitalização de todos os vasos de um experimento semelhante ao descrito acima, seriam necessárias 3 pessoas dia⁻¹, com um dia provavelmente bastante longo.

Após essa digitalização, haveria necessidade ainda de realizar a análise de imagens propriamente dita. Até o momento, a equipe que tem realizado esses trabalhos não conseguiu desenvolver procedimentos automatizados para distinguir os nódulos do solo, em virtude da semelhança de cores e irregularidade no formato dos nódulos. Assim, a identificação dos nódulos necessita ser feita por pesquisadores treinados no aspecto, embora em nossa experiência o treinamento seja relativamente simples, com pouca variação entre os resultados de diferentes pesquisadores. Novamente, com base na experiência acumulada nos trabalhos anteriormente mencionados,

uma equipe composta por 3 pessoas, por exemplo, 1 mestrando e 2 alunos de iniciação científica, deve levar algo em torno de 10 dias de trabalho para analisarem as imagens obtidas, admitindo que a nodulação seja razoavelmente abundante.

Finalmente, embora em teoria seja possível acompanhar um nódulo individual ao longo de seu desenvolvimento, a prática tem indicado que esse acompanhamento não é viável por dificuldades de organização dos dados. Assim, a análise de dados deve seguir as premissas descritas acima de análise de medições repetidas, considerando cada vaso como sendo a unidade básica que foi repetida nas diversas medições.

5. Considerações finais

O conjunto de técnicas descrito neste capítulo não deve ser considerado, na opinião dos autores, como possível substituto das técnicas mais convencionais descritas na primeira seção do trabalho, mas sim como uma técnica adicional, que permite observar características que dificilmente poderiam ser observadas com as medidas, como massa seca de nódulos, em razão de seu caráter necessariamente destrutivo.

6. Referências

ALBUQUERQUE, M. P.; ALBUQUERQUE, M. P.; CANER, E. S.; GESUALDI, A. R. Análise de imagens e visão computacional. In: ESCOLA DO CBPF, 5., 2004, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: CBPF, 2005. p. 145-176.

ALMARAZ, J. J.; ZHOU, X.; SOULEIMANOV, A.; SMITH, D. L. Gas exchange characteristics and dry matter accumulation of soybean treated with Nod factors. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 164, p. 1391-1393, 2007.

ANTÓN, M. R. D. F. Interacciones microorganismos-suelo-planta en la preservación del Medio Ambiente y la Salud. **Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia**, Madrid, ES, v. 70, p. 743-776, 2004.

ARAÚJO, F. A. S.; SOUSA, C. A. D.; CAMPANHARO, M.; COSTA, J. V. T. D.; LIRA JUNIOR, M. A.; STAMFORD, N. P.; FERREIRA, R. L. C. Representação da população de nódulos pelos nódulos visíveis, através de análise de imagem.

In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 30., 2005, Recife.

Anais... Recife: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2005. 1 CD-ROM.

BEHRENS, T.; DIEPENBROCK, W. Using digital image analysis to describe canopies of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) during vegetative developmental stages. **Journal of Agronomy and Crop Science**, Berlin, DE, v. 192, p. 295-302, 2006.

BENIZRI, E.; BAUDOIN, E.; GUCKERT, A. Root colonization by inoculated plant growth promoting rhizobacteria. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 11, p. 557-574, 2001.

BODDEY, R. M.; POLIDORO, J. C.; RESENDE, A. S.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S. Use of the ¹⁵N natural abundance technique for the quantification of the contribution of N₂ fixation to sugarcane and other grasses. **Australian Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 28, p. 889-895, 2001.

BOUMA, T. J.; NIELSEN, K. L.; KOUTSTAAL, B. Sample preparation and scanning protocol for computerised analysis of root length and diameter. **Plant and Soil**, The Hague, v. 218, p. 185-196, 2000.

BOX, G. E. P. Some theorems on quadratic forms applied in the study of analysis of variance problems: I. effects of inequality of variance in the one-way classification. **Annals of the Mathematical Statistics**, Washington, DC, v. 25, p. 290-302, 1954a.

BOX, G. E. P. Some theorems on quadratic forms applied in the study of analysis of variance problems: II. effects of inequality of variance and of correlation between errors in the two-way classification. **Annals of the Mathematical Statistics**, Washington, DC, v. 25, p. 484-498, 1954b.

BRITO, C. J. F. A. de; RODELLA, R. A.; DESCHAMPS, F. C. Anatomia quantitativa da folha e do colmo de *Brachiaria brizantha* Stapf e *B. humidicola*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 33, p. 519-528, 2004.

BUZAS, D. M.; GRESSHOFF, P. M. Short and long-distance control of root development by *LjHARI* during the juvenile stage of *Lotus japonicus*. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 164, p. 452-459, 2007.

CAMPANHARO, M. **Acidez do solo na fixação biológica do nitrogênio em feijão**. 2006. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2006.

CECON, P. R.; SILVA, F. F. E.; FERREIRA, A.; FERRÃO, R. G.; CARNEIRO, A. P. S.; DETMANN, E.; FARIA, P. N.; MORAIS, T. S. S. Análise de medidas

repetidas na avaliação de clones de café 'Conilon'. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 43, p. 1171-1176, 2008.

CHOVANEC, P.; HOVORKA, O.; NOVÁK, K. Visualization of symbiotic tissue in intact root nodules of *Vicia tetrasperma* using GFP-marked *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. **Folia Microbiologica**, Prague, CZ, v. 53, p. 139-146, 2008.

COLE, V. W. L.; GRIZZLE, J. E. Applications of multivariate analysis of variance to repeated measures experiments. **Biometrics**, Washington, DC, v. 41, p. 505-514, 1966.

COSTA, C.; DWYER, L. M.; HAMEL, C.; MUAMBA, D. F.; WANG, X. L.; NANTAIS, L.; SMITH, D. L. Root contrast enhancement for measurement with optical scanner-based image analysis. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, CA, v. 79, p. 23-29, 2001.

COSTA, J. V. T. D. **Metodologia para análise não destrutiva da nodulação**. 2005. 43 f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2005.

COSTA, J. V. T. D.; LIRA JUNIOR, M. A.; FERREIRA, R. L. C.; STAMFORD, N. P.; CAMPANHARO, M.; SOUSA, C. A. D.; ARAÚJO, F. A. S. Relacionamento entre tamanho do nódulo e medições convencionais da nodulação. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 29, p. 47-54, 2007.

COSTA, J. V. T. D.; LIRA JUNIOR, M. A.; STAMFORD, N. P.; FERREIRA, R. L. C.; CAMPANHARO, M.; SOUSA, C. A. D.; ARAÚJO, F. A. S. Avaliação do desenvolvimento de caupi e da nodulação através de determinações destrutiva e não destrutiva. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 30., 2005, Recife. **Anais...** Recife: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2005. 1 CD-ROM.

COSTA, J. V. T.; LIRA JUNIOR, M. A.; FERREIRA, R. L. C.; STAMFORD, N. P.; ARAÚJO, F. A. S. Desenvolvimento de nódulos e plantas de caupi (*Vigna unguiculata*) por métodos destrutivo e não destrutivo. **Caatinga**, Mossoró, v. 19, p. 11-19, 2006.

DAZZO, F. B.; HOLLINGSWORTH, R. I.; PHILIP-HOLLINGSWORTH, S.; SQUARTINI, A.; CHAPMAN, K. A.; CARGILL, L. C.; SALZWEDEL, J.; PETERSEN, M.; PANKRATZ, S.; ORGAMBIDE, G.; TROCH, P. de; OLEN, T. A.; BAKER, D.; MAYA-FLORES, J.; AGGARWAL, A.; HOLLANDER, G. Recent studies on the *Rhizobium*-legume symbiosis. In: GRESSHOFF, P. M.; ROTH, L. E.; STACEY, G.; NEWTON, W. E. **Nitrogen fixation**: achievements and objectives. New York: Chapman and Hall, 1990. p. 199-200.

DÖBEREINER, J. Evaluation of nitrogen fixation in legumes by the regression of total plant nitrogen with nodule weight. **Nature**, London, UK, v. 210, p. 850-852, 1966.

DÖBEREINER, J.; ARRUDA, N. B.; PENTEADO, A. F. Avaliação da fixação do nitrogênio, em leguminosas, pela regressão do nitrogênio total das plantas sobre o peso dos nódulos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 1, p. 233-237, 1966.

DOUGHERTY, E. R. **Digital image processing methods**. New York: CRC, 1994.

EHRHARDT, D. W.; WAIS, R.; LONG, S. R. Calcium spiking in plant root hairs responding to *Rhizobium* nodulation signals. **Cell**, Cambridge, v. 85, p. 673-681, 1996.

FAGAN, E. B.; MEDEIROS, S. L. P.; MANFRON, P. A.; CASAROLI, D.; SIMON, J.; DOURADO NETO, D.; LIER, Q. J. van; SANTOS, O. S. Fisiologia da fixação biológica de nitrogênio em soja. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, Uruguaiana, v. 14, p. 89-106, 2007.

FARIA, S. M.; FRANCO, A. A. **Identificação de bactérias eficientes na fixação biológica de nitrogênio para espécies leguminosas arbóreas**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2002. 16 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 158).

FARN DEN, K. L. F.; ROBERTSON, J. G. Methods for studying enzymes involved in metabolism related to nitrogenase. In: BERGERSEN, J. F. **Methods of evaluating biological nitrogen fixation**. Chichester: John Wiley and Sons, 1980. p. 265-316.

FERNÁNDEZ, G. C. J. Repeated measure analysis of line-source sprinkler experiments. **Hortscience**, Alexandria, v. 26, p. 339-342, 1991.

FIGUEIREDO, M. V. B.; LIRA JUNIOR, M. A.; ARAÚJO, A. S. F.; MARTINEZ, C. R. Fatores bióticos e abióticos à fixação biológica de N₂. In: FIGUEIREDO, M. V. B.; BURITY, H. A.; STAMFORD, N. P.; SANTOS, C. E. R. S. **Microrganismos e agrobiodiversidade: o novo desafio para agricultura**. Guaíba: AgroLivros, 2008. p. 43-68.

FOUCHER, F.; KONDOROSI, E. Cell cycle regulation in the course of nodule organogenesis in *Medicago*. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 43, p. 773-778, 2000.

GAN, Y.; STULEN, I.; KEULEN, H. van; KUIPER, P. J. C. Low concentrations of nitrate and ammonium stimulate nodulation and N₂ fixation while inhibiting specific nodulation (nodule DW g⁻¹ root dry weight) and specific N₂ fixation (N₂

fixed g⁻¹ root dry weight) in soybean. **Plant and Soil**, The Hague, v. 258, p. 281-292, 2004.

GEISSER, J.; GREENHOUSE, S. W. An extension of Box's results on the use of the F distribution in multivariate analysis. **Annals of the Mathematical Statistics**, Washington, DC, v. 29, p. 855-891, 1958.

GUERINOT, M. L. Microbial iron transport. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 48, p. 734-772, 1994.

HARDY, R. W. F.; HOLSTEN, R. D.; JACKSON, E. K.; BURNS, R. C. The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 43, p. 1185-1207, 1968.

HERRIDGE, D. F.; PEOPLES, M. B. The ureide assay for measuring nitrogen fixation by nodulated soybean calibrated by ¹⁵N methods. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 93, p. 495-503, 1990.

HIRSCH, A. M. Developmental biology of legume nodulation. **New Phytologist**, Oxford, v. 122, p. 211-237, 1992.

HUYNH, H.; FELDT, L. S. Condition under which mean square ratios in repeated measurements designs have exact F-distributions. **Journal of the American Statistical Association**, Washington, DC, v. 65, p. 1582-1589, 1970.

HUYNH, H.; FELDT, L. S. Estimation of the Box correction for degrees of freedom from sample data in the randomized block and split-plot designs. **Journal of Educational Statistics**, Washington, DC, v. 1, p. 69-82, 1976.

JORGE, L. A. C.; CRESTANA, S. **Recomendações práticas para utilização do SIARCS 3.0 nos estudos de raízes, cobertura vegetal, folhas e outras aplicações**. São Carlos: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 1996. Não paginado. (Embrapa Instrumentação Agropecuária. Recomendação Técnica, 4).

KUSTER, H.; VIEWEG, M. F.; MANTHEY, K.; BAIER, M. C.; HOHNJEC, N.; PERLICK, A. M. Identification and expression regulation of symbiotically activated legume genes. **Phytochemistry**, Elmsford, v. 68, p. 8-18, 2007.

LALIBERTE, A. S.; RANGO, A.; HERRICK, J. E.; FREDRICKSON, E. L.; BURKETT, L. An object-based image analysis approach for determining fractional cover of senescent and green vegetation with digital plot photography. **Journal of Arid Environments**, London, UK, v. 69, p. 1-14, 2007.

LANA, M. M.; TIJSKENS, L. M. M.; KOOTEN, O. van. Effects of storage temperature and stage of ripening on RGB colour aspects of fresh-cut tomato pericarp using video image analysis. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 77, p. 871-879, 2006.

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**, Collingwood, 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**, Oxford, v. 37, p. 235-239, 2005.

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**, Oxford, v. 32, p. 1463-1467, 2000.

LITTELL, R. C.; HENRY, P. R.; AMMERMAN, C. B. Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 76, p. 1216-1231, 1998.

LITTELL, R. C.; PENDERCAST, J.; NATARAJAN, R. Modelling covariance structure in the analysis of repeated measures data. **Statistics in Medicine**, New York, v. 19, p. 1793-1819, 2000.

MABOOD, F.; GRAY, E. J.; LEE, K. D.; SMITH, D. L. Exploiting inter-organismal chemical communication for improved inoculants. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, CA, v. 86, p. 951-966, 2006a.

MABOOD, F.; ZHOU, X.; LEE, K. D.; SMITH, D. L. Methyl jasmonate, alone or in combination with genistein, and *Bradyrhizobium japonicum* increases soybean (*Glycine max* L.) plant dry matter production and grain yield under short season conditions. **Field Crops Research**, Amsterdam, NL, v. 95, p. 412-419, 2006b.

MALHEIROS, E. B. Precisão de testes F univariados usados em experimentos com medidas repetidas no tempo, quando a condição de esfericidade da matriz de covariâncias não é verificada. **Revista Matemática e Estatística**, Marília, v. 22, p. 23-29, 2004.

MAUCHLY, J. W. Significance test for sphericity of a normal n-variate distribution. **Annals of the Mathematical Statistics**, Washington, DC, v. 11, p. 204-209, 1940.

MILLIKEN, G. A. **Multilevel designs and their analyses**. In: ANNUAL SAS® USERS GROUP INTERNATIONAL CONFERENCE, 28., 2003, Cary. **Proceedings...** Cary: SAS Institute, 2003. p. 263-268.

NEMEC, A. F. L. **Analysis of repeated measures and time series**: an introduction with forestry examples. Victoria: Biometric Information Handbook, 1996. 83 p.

POUSTINI, K.; MABOOD, F.; SMITH, D. L. Low root zone temperature effects on bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants inoculated with *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* pre-incubated with methyl jasmonate and/or genistein. **Acta Agriculturae Scandinavica - Section B: Soil and Plant Science**, Copenhagen, DK, v. 55, p. 293-298, 2005.

REIGH, G.; O'CONNELL, M. Siderophore-mediated iron transport correlates with the presence of specific iron-regulated proteins in the membrane of *Rhizobium meliloti*. **Journal of Bacteriology**, Washington, DC, v. 175, p. 94, 1993.

RUMJANEK, N. G., GAMA, A. S., TRIPLETT, E. W. Bacteriocin production by Bradyrhizobium strains. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON NITROGEN FIXATION, 10. **Abstracts...** St. Petersburg: International Congress on Nitrogen Fixation, 1995. p 433-433.

SAAD, M. M., STAEHELIN, C., BROUGHTON, W. J., DEAKIN, W. J. Protein-protein interactions within type III secretion system-dependent pili of *Rhizobium* sp. strain NGR234. **Journal of Bacteriology**, Washington, DC, v. 190, p. 750-754, 2008.

SAS INSTITUTE. **Repeated measures in the analyst application example:** repeated measures. 2006. Disponível em: <<http://support.sas.com/rnd/app/da/analyst/example.html>>. Acesso em:.

SENA JÚNIOR, D. G.; SANTOS, N. T.; PINTO, F. A. C.; QUEIROZ, D. M.; ZANDONADI, R. S. Efeito da iluminação na segmentação de imagens de plantas de milho atacadas pela lagarta do cartucho. **Engenharia na Agricultura**, Viçosa, v. 12, p. 280-289, 2004.

SILVEIRA, J. A. G.; VIEGAS, R. A.; FIGUEIREDO, M. V. B.; OLIVEIRA, J. T. A.; COSTA, R. C. L. N-compound accumulation and carbohydrate shortage on N₂ fixation in drought-stressed and rewatered cowpea plants. **Spanish Journal of Agricultural Research**, Madrid, ES, v. 3, p. 65-76, 2003.

SILVERSTEIN, K. A. T.; GRAHAM, M. A.; VANDENBOSCH, K. A. Novel paralogous gene families with potential function in legume nodules and seeds. **Current Opinion in Plant Biology**, Oxford, v. 9, p. 142-146, 2006.

SMIT, A. L.; SPRANGERS, J. F. C. M.; SABLİK, P. W.; GROENWOLD, J. Automated measurement of root length with a three-dimensional high-resolution scanner and image analysis. **Plant and Soil**, The Hague, v. 158, p. 145-149, 1994.

SOUSA, C. A. D.; ARAÚJO, F. A. S.; CAMPANHARO, M.; COSTA, J. V. T. D.; LIRA JUNIOR, M. A.; STAMFORD, N. P.; FERREIRA, R. L. C. Nodulação e produção de feijão por método destrutivo e não destrutivo. In: CONGRESSO

BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 30., 2005, Recife. **Anais...** Recife: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2005. 1 CD-ROM.

SOUZA, L. A. G.; BEZERRA NETO, E.; SANTOS, C. E. R. S.; STAMFORD, N. P. Desenvolvimento e nodulação natural de leguminosas arbóreas em solos de Pernambuco. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 42, p. 207-217, 2007.

SÜB, C.; HEMPEL, J.; ZEHNER, S.; KRAUSE, A.; PATSCHKOWSKI, T.; GÖTTFERT, M. Identification of genistein-inducible and type III-secreted proteins of *Bradyrhizobium japonicum*. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, NL, v. 126, p. 69-77, 2006.

TAÍZ, L.; ZIEGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artemed, 2004.

TAVARES, D. B. **Manejo de siratro nos diferentes estágios fenológicos sobre a dinâmica da nodulação**. 2008. 48 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco.

TEIXEIRA, E. F.; CICERO, S. M.; DOURADO NETO, D. Análise de imagens digitais de plântulas para avaliação do vigor de sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, DF, v. 28, p. 159-167, 2006.

TIMMERS, A. C.; AURIAC, M. C.; TRUCHET, G. Refined analysis of early symbiotic steps of the *Rhizobium medicago* interaction in relationship with microtubular cytoskeleton rearrangements. **Development**, Cambridge, v. 126, p. 3617-3628, 1999.

URIBE, L. Formación de nodulos de *Rhizobium*; factores que pueden conferir ventaja competitiva. **Agronomia Costarricense**, San José, CR, v. 18, p. 121-131, 1994.

VALLEJO, G.; LOZANO, L. M. Modelos de análisis para los diseños multivariados de medidas repetidas. **Psicothema**, Oviedo, v. 18, p. 293-299, 2006.

VIEIRA JUNIOR, P. A.; DOURADO NETO, D.; CICERO, S. M.; JORGE, L. A. C.; MANFRON, P. A.; MARTIN, T. N. Estimativa da área foliar em milho através de análise de imagens. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 5, p. 58-66, 2006.

VIKMAN, P. A.; VESSEY, J. K. Ontogenetic changes in root nodule subpopulations of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). III. Nodule formation, growth and degradation. **Journal of Experimental Botany**, London, UK, v. 44, p. 579-586, 1993.

VILLALOBOS, D. M. G.; LLAQUE, J. G.; MORENO, A. A. Q.; GUILLÉN, J. L. R.; MÉNDEZ, J. A. A. Análisis de tres procedimientos estadísticos para la evaluación del crecimiento de mautas mestizas bajo diferentes regímenes nutricionales.

Revista Científica, Campo Grande, v. 17, p. 136-142, 2007.

WASSEM, R.; KOBAYASHI, H.; KAMBARA, K.; LE, Q.; WALKER, G. C.; BROUGHTON, W. J.; DEAKIN, W. J. TtsI regulates symbiotic genes in *Rhizobium* species NGR234 by binding to tts boxes. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 68, p. 736-748, 2008.

WILSON, D. O.; REISENAUER, H. M. Determination of leghemoglobin in legumes nodules. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 6, p. 27-30, 1963.

WOLFINGER, R.; CHANG, M. **Comparing the SAS® GLM and MIXED procedures for repeated measures**. [Cary: SAS Institute], 2006.

XAVIER, G. R.; MARTINS, L. M. V.; RIBEIRO, J. R. A.; RUMJANEK, N. G. Especificidade simbiótica entre rizóbios e acessos de feijão-caupi de diferentes nacionalidades. **Caatinga**, Mossoró, v. 19, p. 25-33, 2006.

XAVIER, L. H.; DIAS, C. T. S. Acurácia do modelo univariado para análise de medidas repetidas por simulação multidimensional. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 58, p. 241-250, 2001.

