

## A NUCLEAR POLYHEDROSIS VIRUS OF *HYPOSIDRA TALACA* (WALKER)

Oleh:

Tosihiko Hukuhara<sup>1)</sup>  
Yasuhisa Kunimi<sup>1)</sup>  
Witjaksono<sup>2)</sup> and  
Arman Wijonarko<sup>2)</sup>

### Intisari

Suatu virus polihedrosis inti (NPV) telah diisolasi dari ulat *Hyposidra talaca* (Lepidoptera: Geometridae) yang hampir mati dari Jawa Tengah. Ukuran diameter rata-rata polihedra tersebut adalah 0,8  $\mu\text{m}$ , sedangkan ukuran rata-rata nukleokapsid yang berbentuk batang yang dimurnikan dari polihedra adalah panjang 359 nm dengan lebar 54 nm.

### Abstract

A nuclear polyhedrosis virus was isolated from moribund loopers of *Hyposidra talaca* (Lepidoptera: Geometridae) in Central Java. The average size of polyhedra was 0.8  $\mu\text{m}$  in diameter. The average size of rod-shaped nucleocapsids purified from polyhedra was 359 nm in length and 54 nm in width.

### Introduction

Nuclear polyhedrosis viruses (NPVs) have been successfully used in biological control of several insect pests (Maramorosch and Sherman, 1985). The viruses belong to the subfamily Eubaculovirinae of the family Baculoviridae (Francki et al., 1991). Virions consist of one or more rod-shaped nucleocapsids enclosed within a single envelope.

*Hyposidra talaca* is a common and polyphagous caterpillar of various woody plants and distributed throughout South-East Asia (Kalshoven, 1981). This work was undertaken under the JSPS-DGHE program on biological control in sustainable tropical agriculture to assess ecologically the effect of specific control agents on the insect population in a tea plantation owned by Pagilaran Co., Batang, Pekalongan.

<sup>1)</sup>Fac. Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology.

<sup>2)</sup>Department of Entomology and Plant Protection, Fac. Agriculture, Gadjah Mada University.

## Materials and Methods

Dead or diseased *Hyposidra* loopers on tea trees were collected and diagnosed microscopically as follows. Their internal tissues were placed in a drop of water on a slide glass and slightly pressed with a cover glass. The wet-mount preparations were examined under the objective lens (x20 or x40) of an ordinary light microscope to determine the presence of characteristic occlusion bodies, or polyhedra.

Polyhedra were purified from the cadavers of infected loopers by differential centrifugations in distilled water. For virus purification, polyhedra were dissolved in 0.1M glycine buffer (pH 12) for 30 min. The resulting suspension was overlaid on 20% w/w sucrose and centrifuged for 60 min at 60,000g. The pellet was suspended in distilled water and subjected to differential centrifugations for 10 min at 4,500g and for 60 min at 40,000g. The final pellet was suspended in a small amount (ca 0.1 ml) of distilled water. This preparation or purified polyhedra was placed on grids covered with a Formvar membrane, stained with 3% uranyl acetate and examined with JEM 100C electron microscope at 100 kV.

## Results and Discussion

On August 25, 1993, two moribund loopers were collected from tea trees during a survey of diseased insects in a tea plantation. They hanged with their legs attached to the branches. Their skins were fragile and the liquefied internal contents oozed out from the wound produced by even a gentle touch (Fig. 1). Light-microscope examination of the insect tissues revealed the presence of polyhedra in the nuclei of the fat body, tracheal matrix and blood cells. The polyhedra ranged from 0.6 to 1.2 microns in diameter and averaged 0.8 microns. These are the typical signs of nuclear polyhedrosis.

On the next day, we surveyed another district of the same plantation, Andong Sili, where the insect had been more abundant in the preceding years, and found a tea tree which was infested with approximately 60 fully-grown loopers. All of them showed outward signs of NPV infection. When trees in the surrounding area of about 1 hectare were examined, only six of them, or approximately 0.3%, were heavily infested with NPV-infected loopers. Other trees were little damaged by the loopers.

These results indicated that there was heavy damage in trees where egg clusters were deposited and that the high larval density favored the horizontal virus transmission, which resulted in high incidence of NPV infection.



Fig. 1. *Hyposidra talaca* looper dead of nuclear polyhedrosis on a tea twig.

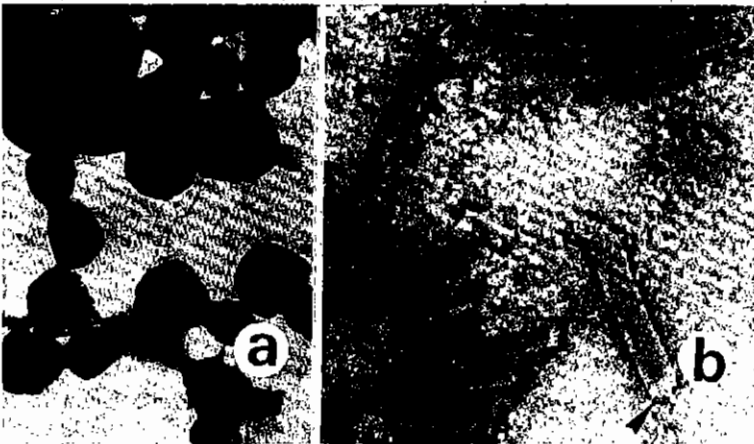


Fig. 2. Electron micrographs of a nuclear polyhedrosis virus of *Hyposidra talaca*. (a) Purified polyhedra. 13,000x. (b) Negatively stained nucleocapsids. Note the presence of a nipple-like structure on one end (arrowhead). 72,600x.

Electron microscopy of purified polyhedra revealed that some of them had been partially dissolved during storage presumably due to the action of alkaline gut juice (Fig. 2a). Virus preparations obtained from solubilized polyhedra revealed the presence of a large number of rod-shaped nucleocapsids (Fig. 2b). The average size and standard error of 10 nucleocapsids were as follows: length,  $359 \pm 27$  nm; width,  $54 \pm 5$  nm.

This is the first record of a nuclear polyhedrosis of this insect. Biological control of insect pests of tea plantations is all the more important because the use of chemical insecticides is restricted on account of safety consideration.

### Acknowledgements

We thank Ir. Harijadi, MS., Manager of Pagilaran Co. for his support of our study and Ms. Kazuko Hukuhara for her assistance in collecting insect specimens.

### References

1. Maramorosch, K. and K. E. Sherman (1985) *Viral Insecticides for Biological Control*, Academic Press, Inc., New York 809 pp.
2. Francki, R. I. B., C. M. Fauquet, D. L. Knudson and T. Brown (1991) Classification and nomenclature of viruses. *Arch. rol. suppl.* 2:1 - 450.
3. Kalshoven, L. G. E. (1981) *Pests of Crops in Indonesia*. P.T. Ichtiar Baru, Van Hoeve, Jakarta. 701pp.

**KEMAMPUAN MERESTORASI SISTEM  
PERAKARAN DAN AKTIVITAS FIKSASI N<sub>2</sub>  
PADA TANAMAN CLOVER PUTIH  
(*Trifolium repens L.*)  
SETELAH MENGALAMI DEFOLIASI BERAT<sup>1)</sup>  
(The Restoration Capacity of Root Systems and  
Nitrogen Fixation on White Clover  
(*Trifolium repens L.*) following a heavy Defoliation)**

Djoko Muljanto <sup>2)</sup>

**Abstract**

Experiments conducted under controlled conditions on white clover allowed to study the effect of plant defoliation on the restoration of root growth, the morphology of root nodules, and nitrogen fixation activity. Results of these experiments showed that white clover could restore the nitrogen fixation system by 1) the functioning of the old nodules due to the activity at apical meristem providing new cells that could be infected by Rhizobium bacteria, 2) increasing the activity in nitrogen fixation of new root nodules compared to the infected nodule before defoliation, and 3) the regeneration of roots provide a new site for nodulation.

Key words: White clover (*Trifolium repens L.*), hydroponical culture, rhizotrons, defoliation, N<sub>2</sub> fixation, root nodules.

**Intisari**

Penelitian ini dilaksanakan didalam ruang Ecotron yang bertujuan untuk mempelajari pengaruh *defoliasi berat* terhadap pertumbuhan akar, aspek morfologi bintil akar, serta aktivitas *fiksasi N<sub>2</sub>* udara oleh tanaman *clover* putih.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa tanaman *clover* mampu merestorasi sistem fiksasi N<sub>2</sub> lebih efisien, yaitu dengan jalan: 1) Fiksasi N<sub>2</sub> oleh bintil akar lama karena berfungsinya kembali *meristem apikal* yang mampu membentuk sel-sel baru yang memungkinkan dapat diinfeksi oleh bakteri Rhizobium, 2) Populasi bintil akar baru yang lebih efisien dan nampak lebih kuat dalam menyemat N<sub>2</sub> udara daripada bintil akar hasil infeksi bakteri Rhizobium sebelum pemangkasan, dan 3) Pertumbuhan sistem perakaran baru dapat menyediakan tempat untuk diinfeksi bakteri Rhizobium.

Kata-kata kunci: Clover putih (*Trifolium repens L.*), kultur hidroponik, rhizotron, defoliiasi, fiksasi N<sub>2</sub> udara, bintil akar.

<sup>1)</sup>Sebagian dari Thesis Doktor dalam bidang Agronomi di INPL Perancis.

<sup>2)</sup>Dosen Fakultas Pertanian UGM.

## Pengantar

Pengaruh faktor agronomi terhadap aktivitas fiksasi  $N_2$  secara simbiotik telah diketahui lama. Oleh karena itu, setiap perlakuan pemangkasan tajuk harus diikuti pemberian tambahan hara nitrogen untuk memacu pertumbuhan tajuknya. Chu & Robertson (1974) dan Gordon *et al.* (1986) menunjukkan bahwa aktivitas fiksasi  $N_2$  akan turun dengan cepat setelah terjadi defoliiasi. Sementara itu nampak bahwa aktivitas fiksasi  $N_2$  akan diperbaiki beberapa hari setelah terjadi inisiasi daun baru. Pada keadaan tersebut akan terjadi perubahan pada bintil akarnya setelah terjadi pemangkasan dan setelah terjadi pertumbuhan tajuk baru. Penelitian ini dilakukan untuk menjawab beberapa pertanyaan berkaitan dengan pemangkasan tajuk tanaman:

- 1° Bagaimana terjadinya perubahan-perubahan dalam sistem perakaran (morfologi bintil akar dan dinamika sistem perakarannya).
- 2° Bagian organ mana yang terpengaruh oleh perlakuan pemangkasan berat dan bagaimana pengaruhnya terhadap aktivitas fiksasi  $N_2$  udara.

## Bahan dan Metoda Penelitian

### 1. Bahan Penelitian

#### \* Perkecambahan Biji

Varietas *clover* yang dipakai adalah HUIA (tipe *Hollandicum*). Sebelum dilakukan perkecambahan, benih *clover* tersebut disterilkan dengan kalsium hipoklorid 9% selama 5 menit. Perkecambahan benih dilakukan pada media hidroponik di atas *vermiculite* yang telah disterilkan yang ditempatkan di dalam bak PVC  $6 \times 37 \times 55$  cm dengan larutan hara Wood, Cooper & Holding (WCH) (Wood *at al.*, 1983) sebanyak 12 liter. Aerasi pada sistem hidroponik tersebut diberikan lewat sirkuit gas yang diletakkan pada dasar bak perkecambahan. Didalam larutan WCH ditambahkan hara nitrogen dengan dosis tinggi (15 mM) untuk mencegah terjadinya infeksi *Rhizobium* yang berasal dari alam. Tanaman *clover* ditransplantasi pada umur 15 hari, dan sebelumnya dicelupkan dalam suspensi *Rhizobium* selama 8 jam. *Strain* *Rhizobium* yang digunakan adalah *R. Leguminosarum b.v. trifolii* yang berasal dari Pusat Penelitian di Bouzule Perancis.

### \* Media Tanaman

Penelitian dilakukan didalam Ecotron, ruangan yang faktor lingkungannya dapat diatur secara otomatis. Pencahayaan digunakan 10 lampu merkuri HQI 400 W yang dapat memberikan foton sebesar  $300 \mu\text{mol. m}^{-2}\text{detik}^{-1}$ . Panjang hari 16 jam. Suhu siang hari  $22^{\circ}\text{C}$  dan suhu malam hari  $18^{\circ}\text{C}$ . Penelitian dilaksanakan dalam kultur hidroponik dan *rhizotron*.

#### – Kultur Hidroponik

Kultur hidroponik direalisasikan di dalam bak PVC dengan ukuran  $28 \times 37 \times 57$  cm, yang mempunyai volume 45 liter. Bak tersebut diisi dengan larutan hara WCH sebanyak 20 liter dan diinokulasi dengan bakteri *Rhizobium*. Aerasi dilakukan dengan memberikan aliran udara lewat sirkuit pada dasar bak PVC. Tanaman ditempatkan pada lembar penyangga kecil dari PVC sebanyak 120 lembar kecil per bak. Setiap lembar penyangga berisi 5 tanaman. Untuk menghindari terjadinya akumulasi ion nitrit dalam larutan makanan, dilakukan pergantian larutan WCH baru setiap minggu.

#### – Kultur *Rhizotron* Mini

*Rhizotron* mini dibuat dari bahan plastik transparan dengan ukuran  $25 \times 10 \times 3$  cm dan diisi dengan campuran tanah dan pasir (2:1). Setiap *rhizotron* ditanami 1 tanaman, kemudian dibalut dengan kertas aluminium dan diletakkan berjajar miring. Kultur *rhizotron* digunakan untuk mempelajari morfologi bintil akar dan dinamika sistem perakarannya.

#### – Pemangkasan

Tanaman dipangkas setelah berumur 60 hari dengan cara memotong semua bagian tajuk tanaman (*stolon*, tangkai dan daunnya) dan disisakan kurang lebih setinggi 1 cm.

## 2. Metode Penelitian

### \* Metoda Pengukuran Aktivitas Reduksi Asetilen (ARA)

Salah satu pengukuran aktivitas enzim nitrogenase adalah dengan metode ARA (Kock & Evans, 1966, Hardy *et al.* 1973, Halliday & Pate, 1976) yang telah diadaptasikan untuk tanaman clover oleh Balandreau & Dommergues, (1973). Aktivitas reduksi asetilen (ARA) dinyatakan dalam:

- n mol. $\text{C}_2\text{H}_4$  g<sup>-1</sup> berat segar bintil akar
- n mol. $\text{C}_2\text{H}_4$  g<sup>-1</sup> berat kering tajuk tanaman
- n mol. $\text{C}_2\text{H}_4$  tanaman<sup>-1</sup>.

### \* Pengukuran Panjang Total Akar

Panjang total akar diukur dengan metode "intersection" dari Newman (1966) yang disederhanakan oleh Tennant (1975), dan dihitung dengan menggunakan rumus:  $R = 11/14 \times N \times 0,786$ , dimana  $R$  = panjang akar total (cm),  $N$  = jumlah titik perpotongan,  $0,786$  = konstanta untuk ukuran garis  $1 \times 1$  cm.

## Hasil

### 1. Pertumbuhan Biomasa Tajuk dan Sistem Perakaran

Dengan pemangkasan organ tanaman di atas tanah dan menyisakan batang setinggi kurang lebih 1 cm, nampak bahwa inisiasi pertumbuhan tajuknya lambat. Sepuluh hari setelah pemangkasan baru terjadi pertumbuhan tajuknya kembali, walaupun pembentukan biomasanya terlihat tidak cukup banyak (hanya kira-kira sepertiga bagian dari biomasa tanaman kontrolnya setelah satu bulan dipangkas). Pertumbuhan sistem perakaran akan dihambat dengan adanya pemangkasan bagian tajuknya. Sepuluh hari setelah terjadi pertumbuhan tajuk akan nampak biomasa sistem perakarannya terjadi kenaikan, walaupun satu bulan setelah pemangkasan biomasanya tetap lebih rendah dari tanaman kontrolnya (tabel 1).

Tabel 1. Pengaruh pemangkasan berat terhadap pertumbuhan biomasa tajuk dan akar tanaman (rata-rata dari 3 ulangan)

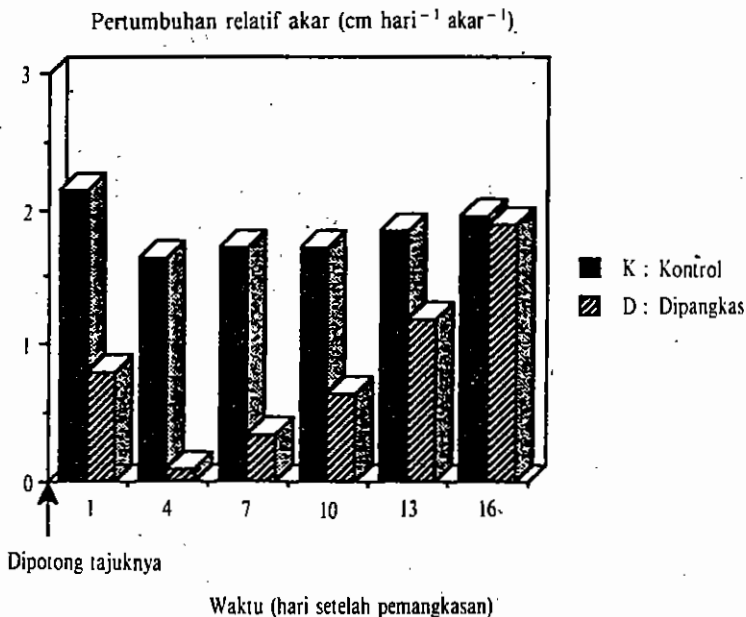
Waktu (hari setelah defoliasi)	1	5	10	16	23	30
a. Berat Kering tajuk (mg 5 <sup>-1</sup> tanaman)						
Dipangkas	39,7f	38,1f	82,8f	224,6cf	852,9de	598,3cde
Tidak Dipangkas	468,6def	605,4cde	767,8cd	978,5c	1443,3b	1806,8a
b. Berat Kering akar (mg 5 <sup>-1</sup> tanaman)						
Dipangkas	109,0c	73,1c	97,2c	137,7c	214,8bc	225,5bc
Tidak dipangkas	126,6c	179,5bc	194,8bc	291,5b	424,8a	496,6a

Keterangan: nilai rata-rata yang diikuti huruf yang sama pada tiap baris atau kolom, tidak ada beda nyata pada jenjang 5% DMRT.

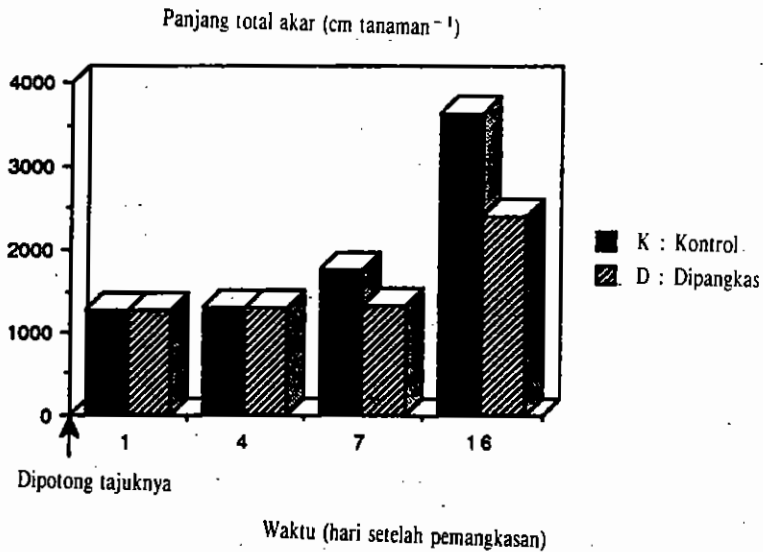


## 2. Dinamika Sistem Perakaran

Pengamatan dinamika sistem perakaran tanaman *clover* ini dilakukan dengan menggunakan media dalam *rhizotron*. Dari pengamatan yang ada, menunjukkan bahwa pemangkasan bagian tajuk tanaman (tangkai daun dan *stolon*) dengan menyisakan 1 cm dari permukaan tanah akan menyebabkan terhambatnya pertumbuhan sistem perakarannya. Perpanjangan relatif akar ( $\text{cm hari}^{-1} \text{akar}^{-1}$ ) akan menurun tajam sehari setelah dilakukan pemangkasan ( $0,8 \text{ cm hari}^{-1} \text{akar}^{-1}$ ) dibandingkan dengan tanaman kontrolnya sebesar  $1,65 \text{ cm hari}^{-1} \text{akar}^{-1}$  (gambar 1). Disamping itu dapat diketahui pula bahwa sistem perakarannya akan dapat tumbuh kembali secara proporsional dengan pertumbuhan tajuk tanaman (tabel 1). Pada tanaman kontrol yang tidak dipangkas, laju perpanjangan akar tanaman nampak lebih stabil, akan tetapi pada tanaman yang dipangkas tajuknya, perpanjangan akar bertambah secara berangsur-angsur sesuai dengan pertumbuhan kembali bagian tajuknya (gambar 1). Perpanjangan relatif akar tanaman yang dipangkas akan mampu menyamai tanaman kontrolnya 16 hari setelah pemangkasan, walaupun panjang total akar tanaman yang dipangkas tetap lebih rendah daripada tanaman kontrolnya (gambar 2).



Gambar 1. Pertumbuhan relatif akar ( $\text{cm hari}^{-1} \text{akar}^{-1}$ ) setelah pemangkasan berat dan setelah terjadinya restorasi bagian tajuknya. K = tanaman tidak dipangkas (kontrol), D = tanaman dipangkas bagian tajuknya (*stolon* dan tangkai daun) dan disisakan 1 cm dari permukaan tanah.



Gambar 2. Hubungan antara panjang total akar (cm tanaman<sup>-1</sup>) dengan waktu setelah pemangkasan bagian tajuknya.

### 3. Perubahan Warna dan Biomasa Bintil Akar

#### \* Warna Bintil Akar

Pemangkasan tajuk tanaman akan mempengaruhi warna bintil akar dari merah kecoklatan menjadi hijau pucat. Perubahan warna tersebut terjadi 4 hari setelah pemangkasan. Setelah tajuk tanaman tumbuh kembali, nampak hanya pada bagian pangkal bintil akar yang tetap berwarna kehijau-hijauan. Hal ini menunjukkan bahwa didalam jaringan tanaman terjadi perbaikan sintesa *leghemoglobin*.

#### \* Biomasa Bintil Akar

Parameter biomasa yang diamati antara lain berat segar dan jumlah bintil akar tanaman. Kedua parameter tersebut sangat dipengaruhi oleh pemangkasan tajuk tanaman dan terlihat tidak terjadi perubahan selama 10 hari setelah pemangkasan. Hal ini menunjukkan bahwa penurunan biomasa bintil akar akan terjadi 5 hari setelah pemangkasan (tabel 2). Pertumbuhan tajuk pada periode ini tidak memungkinkan terjadinya infeksi akar tanaman, yang ditunjukkan oleh biomasa dan jumlah bintil akarnya yang jauh lebih rendah dibandingkan dengan kontrolnya (tanpa pemangkasan). Sebaliknya, pada akhir pertumbuhan tajuk tanaman, biomasa bintil akar nampak sama dengan tanaman kontrolnya.

Tabel 2. Pengaruh pemangkasan berat terhadap pertumbuhan biomasa dan jumlah bintil akar (rata-rata dari 3 ulangan)

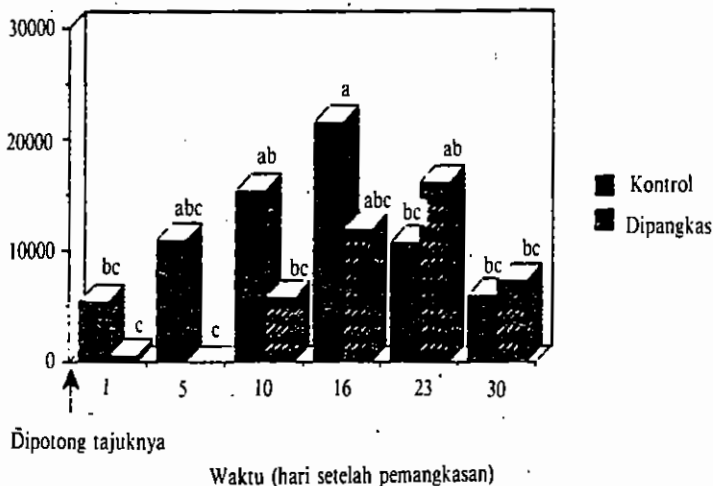
Waktu (hari setelah defoliiasi)	1	5	10	16	23	30
a. Berat segar bintil akar (mg 5 <sup>-1</sup> tanaman)						
Dipangkas	75,2	82,0	105,2	169,5	233,8	288,6
Tidak Dipangkas	131,4	183,9	183,3	227,4	371,8	450,5
b. Jumlah bintil akar 5 <sup>-1</sup> tanaman						
Dipangkas	192bcd	162cd	146d	242bcd	264bcd	310bc
Tidak dipangkas	189cd	200bcd	240bcd	332b	552a	476a

Keterangan: nilai rata-rata yang diikuti huruf yang sama pada tiap baris atau kolom, tidak ada beda nyata pada jenjang 5% DMRT.

#### 4. Aktivitas Reduksi Asetilen (ARA)

Aktivitas reduksi asetilen (ARA) pada tanaman yang dipangkas akan melebihi tanaman kontrol (tanpa pemangkasan) 3 minggu setelah pertumbuhan tajuknya kembali. Hal ini disebabkan karena sistem fiksasi N<sub>2</sub> lebih efisien yang dihubungkan dengan umur bintil akar yang lebih efektif karena berat segar dan jumlah bintil yang lebih rendah pada tanaman yang dipangkas gambar 3).

ARA (n mol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> berat segar bintil akar)



Gambar 3. Hubungan antara aktivitas reduksi asetilen (10<sup>-9</sup> mol. C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> jam<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> berat segar bintil akar) dengan pertumbuhan tajuk (tanaman setelah mengalami defoliiasi).

Aktivitas fiksasi  $N_2$  pada tanaman kontrol mencapai titik optimal 10 minggu setelah perkecambahan. Setelah periode tersebut, aktivitas reduksi asetilen (ARA) tanaman akan turun dengan cepat yang disebabkan karena sejumlah bintil akar tidak aktif lagi menyemat  $N_2$  udara (walaupun biomasa bintil akar naik antara hari 16 dan 23 setelah pemangkasan atau 76 - 83 hari setelah perkecambahan). Dalam hal yang sama, efisiensi bintil akar dalam penyematan  $N_2$  akan turun karena ARA per tanaman juga turun dengan cepat.

## 5. Diskusi

### \* Dinamika Perakaran

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa pertumbuhan akar dipengaruhi oleh pemangkasan bagian tajuk tanaman yang menyebabkan penurunan transport karbon ke bagian meristem akar (Whiteman, 1970). Butter *et al.* (1959) mengamati kejadian penuaan (*senescence*) jaringan akar yang ditunjukkan penurunan berat kering akar apabila dibandingkan dengan tanaman kontrolnya yang tidak dipangkas. Sementara itu, pemangkasan mempengaruhi pengurangan cadangan makanan potensial yang dimobilisasi dari *stolon*, dalam hal ini remobilisasi yang terjadi paling kuat dari tempat cadangan makanan dalam akar yang tertinggal.

Pemangkasan tajuk tanaman akan mempengaruhi dua hal penting, yaitu:

- Absorpsi hara mineral dan air akan turun karena turunnya volume perakaran, walaupun laju pertumbuhan tanaman lebih lambat yang menyebabkan keperluan akan hara tanaman dan air tidak begitu besar.
- Pertumbuhan relatif akar akan turun dan hilangnya berat kering akar berhubungan dengan penurunan tempat yang potensial dari akar muda untuk dapat diinfeksi oleh bakteri *Rhizobium*.

### \* Bintil Akar

Dari hasil pengamatan menunjukkan bahwa jumlah bintil akar pertanaman dan hasil fiksasi  $N_2$  lebih rendah pada periode 10 hari pertama setelah pemangkasan. Setelah periode tersebut, ARA akan naik kembali dan akan dapat melebihi tanaman kontrolnya, walaupun berat segar bintil akar dan jumlahnya lebih rendah daripada tanaman kontrolnya (tabel 2). Laperrière (1984) menunjukkan bahwa tanaman yang dipangkas akan terjadi pertumbuhan kembali sistem fiksasinya yang lebih efisien yang disebabkan oleh fiksasi  $N_2$  berasal dari bintil akar yang masih tertinggal dan aktivitas yang berasal

dari bintil baru. Bintil akar yang banyak pada sistem perakaran akan dihasilkan antara 10 – 16 hari setelah pemangkasan.

Penyebab terjadinya penghambatan dan pertumbuhan kembali aktivitas penyematan  $N_2$  udara dari bintil akar setelah pemangkasan, peranan oksigen merupakan alasan yang biasa diajukan. Beberapa peneliti mengamati terjadinya nekrosis secara total pada bintil akar yang disebabkan adanya *defoliiasi* (Butler *et al.* 1959; Whiteman, 1970). Didalam pengamatan penelitian ini tidak dijumpai *nekrosis* bintil akar, tetapi pengaruh yang sama adalah terjadinya perubahan warna dari bintil akar tanaman.

Hal tersebut nampak bahwa tanaman *clover* mampu mengadakan regenerasi bagian tajuknya secara cepat, walaupun hanya berasal dari beberapa nodia dari *stolon* yang tertinggal setelah pemangkasan. Daun-daun baru akan tumbuh lagi setelah 2 hari terjadinya pemangkasan yang disebabkan adanya cadangan makanan karbohidrat yang ada (Vez, 1961; Lapérière, 1984, Robin, 1989). Kandungan sukrosa dalam *stolon* dan dalam sistem perakarannya akan naik setelah 4 @ 5 hari, dan kandungan pati akan menjadi normal kembali 2 minggu setelah pemangkasan (Gordon, *et al.*, 1986).

### Kesimpulan

Walaupun tanaman diperlakukan dengan pemangkasan berat pada bagian tajuknya (ditinggalkan 1 cm dari permukaan tanah), nampak bahwa tanaman *clover* mampu merestorasi sistem *fiksasi*  $N_2$  lebih efisien, yaitu dengan jalan:

- *Fiksasi*  $N_2$  oleh bintil akar lama karena berfungsinya kembali meristem apikal yang mampu membentuk sel-sel baru yang memungkinkan dapat diinfeksi oleh bakteri *Rhizobium*.
- Populasi bintil akar baru yang lebih efisien dan nampak lebih kuat dalam menyemat  $N_2$  udara dibandingkan dengan bintil akar hasil infeksi bakteri *Rhizobium* sebelum pemangkasan.
- Pertumbuhan sistem perakaran baru dapat menyediakan tempat untuk diinfeksi bakteri *Rhizobium*.

### Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih ditujukan kepada Prof. DR. A. Guckert dan DR. C. Robin, advisor dan co-advisor program Doktor dalam bidang Ecofisiologi Tanaman di ENSALA-INPL Perancis, karena bimbingan dan pemberian ijin beliau untuk dapat menggunakan fasilitas di laboratorium "Ecofysiologie végétale, ENSAIA-INPL Nancy-France" selama penelitian ini berlangsung.

## Daftar Pustaka

- Balandreau J. and Domerques Y., 1973. Assaying nitrogenase ( $C_2H_2$ ) activity in the field. *Bull. Ecol. Res. Comm. (Stockholm)*, 17: 41-51.
- Butler G.W. Greenwood R.M. and Soper K., 1959. Effect of shading and defoliation and the turnover of root and nodule tissue of plants of *Trifolium repens*, *Trifolium pratense* and *Lotus uliginosus*. *N.Z.J. Agric. Res.*, 2: 415-426.
- Chu, A.C.P. and Robertson A.G., 1974. The effects of shading and defoliation on nodulation and nitrogen fixation by white clover. *Plant and Soil*, 41: 509-519.
- Gordon A.J., Ryle G.J.A., Mitchell D.F., Lowry K.H. and Powell C.E., 1986. The effect of defoliation on carbohydrate, protein and leghaemoglobine content of white clover nodules. *Annals. of Bot.*, 58: 141-154.
- Halliday J. and Pate J.S., 1976. Symbiotic nitrogen fixation by coralloid roots of the cycad *Macrosamia riedlei*: Physiological characteristics and ecological significance. *Aust. J. Plant Physiol.*, 3: 349-358.
- Hardy R.V.F., Burns R.C. and Holdsten R.D., 1973. Application of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. *Soil Biol. Biochem.*, 5: 47-81.
- Kock B. and Evans H.J., 1966. Reduction of acetylene to ethylene by soybean root nodules. *Plant Physiol.*, 47: 453-456.
- Laperrière C., 1984. Etude de la fixation d'azote par le trèfle blanc (*Trifolium repens* L.). Aspects biologiques et agronomiques. Thèse Sème Cycle INPL., ENSALA, Nancy. 99p.
- Newman E.I., 1966. A method of estimating the total length of root in sample. *J. Appl. Ecol.*, 3, 691-696.
- Robin C., 1989. Contribution à l'étude du transport et de la distribution des photo-assimilats chez le trèfle blanc (*Trifolium repens* L.). Thèse INPL, ENSAIA, Nancy, 131p.
- Tennant D., 1975. A test of a modified line intersect method of estimating root length, Department of Agriculture, South Perth, Western Australia: 995-1001.
- Vez A., 1961. Etude du développement du trèfle blanc en relation avec les fluctuations des quelques substance organiques. *Bull. Soc. Botanique Suisse*, 71: 118-173.
- Whiteman P.C., 1970. Seasonal changes in growth and nodulation of perennial tropical pasture legumes in the field. II. Effects of controlled defoliation levels on nodulation of *Desmodium intortum* and *Phaseolus atropurpureous*. *Aust. J. Agric. Res.*, 21: 207-214.
- Wood M., Cooper J.E. and Holding A.J., 1983. Method to assess the effects of soil acidity factors on legume-Rhizobium symbiosis. *Soil Biol. Biochem.*, 15(1): 123-124.