

PEMBINTILAN DAN PENAMBATAN NITROGEN PADA TANAMAN KACANG TANAH

Suryantini

Balai Penelitian Tanaman Aneka Kacang dan Umbi

PENDAHULUAN

Kacang tanah sebagai anggota family Leguminosae memiliki kemampuan membentuk bintil akar dan menambat nitrogen udara melalui hubungan simbiosis dengan bakteri rhizobium. Tanaman kacang tanah berfungsi sebagai inang, menyediakan tempat bagi rhizobium dalam bintil akar, dan energi untuk menambat nitrogen. Sebaliknya tanaman menerima nitrogen yang ditambat dari bintil untuk nutrisi dan bahan baku protein.

Nitrogen merupakan salah satu unsur pokok dalam produksi tanaman pangan khususnya kacang-kacangan, dengan penambatan nitrogen secara simbiotik, didapatkan sumber yang murah dan dapat membantu mengurangi biaya produksi terutama pada tanah yang tidak subur. Kacang tanah memiliki kapasitas penambatan nitrogen yang tinggi. Menurut Booger dan van Rossum (2006) jumlah nitrogen yang diakumulasi oleh kacang tanah lebih tinggi dibanding kacang-kacangan tropis lainnya. Giller (2001) melaporkan bahwa potensi penambatan nitrogen pada kacang tanah sekitar 21–206 kg N/ha/tahun, tergantung pada varietas, efisiensi rhizobium, kondisi tanah dan iklim. Penambatan nitrogen pada kacang-kacangan tergantung pada pembentukan bintil oleh rhizobium. Tanpa adanya massa bintil yang berisi strain rhizobium yang efektif menambat nitrogen, maka penambatan nitrogen tidak akan terjadi.

RHIZOBIUM

Rhizobium adalah salah satu bakteri yang sangat bermanfaat bagi pertanian. Beberapa rhizobium bersifat spesifik, yaitu hanya membentuk bintil pada kacang-kacangan tertentu, sementara yang lain mungkin membentuk bintil pada beberapa kacang-kacangan. Kacang tanah termasuk dalam kelompok tanaman “Cowpea cross inoculation”, yaitu kelompok yang anggotanya terdiri dari beberapa spesies tanaman leguminosa, di mana strain rhizobium yang menjadi pasangan simbiosis dari salah satu tanaman dapat menginfeksi tanaman lainnya dalam kelompok tersebut. Keistimewaan tersebut menyebabkan pembintilan secara alami pada tanaman kacang tanah seringkali terjadi. Meskipun demikian, diperlukan suatu spesifikasi yang kuat antara satu varietas kacang tanah dengan strain rhizobium tertentu yang mengarah kepada penambatan nitrogen yang lebih efektif. Oleh karena itu, pengujian yang teliti perlu dilakukan apabila memperkenalkan varietas kacang tanah yang baru di suatu daerah.

PROSES INFEKSI DAN PEMBENTUKAN BINTIL

Sebelum terjadi infeksi atau masuknya sel rhizobium ke dalam akar tanaman, terjadi komunikasi molekular antara mikrosimbion (rhizobium) dan makrosimbion (tanaman kacang-kacangan) yang merupakan suatu keharusan untuk saling mengenali calon mitra simbiosis yang kompatibel. Kekhususan dalam identifikasi tersebut nampaknya wajib untuk menghindari mikroorganisme yang tidak menguntungkan atau parasit memasuki tanaman kacang-kacangan. Sinyal molekular yang terlibat dalam komunikasi legume-

rhizobial tersebut ada dua macam, yaitu sinyal yang berasal dari tanaman dan sinyal yang berasal dari bakteri. Sinyal dari tanaman meliputi flavonoid (Göttfert 1993; van Rhijn dan Vanderleyden 1995) dan glikoprotein (lektin) (Kijne 1992). Sedangkan sinyal dari bakteri meliputi lipochitin oligosakarida (LCOS) (Spaink 1994; Downie 1994; van Rhijn dan Vanderleyden 1995), juga disebut faktor Nod, serta poli-dan oligosakarida (Kijne, 1992; Kannerberg dan Brewin 1994).

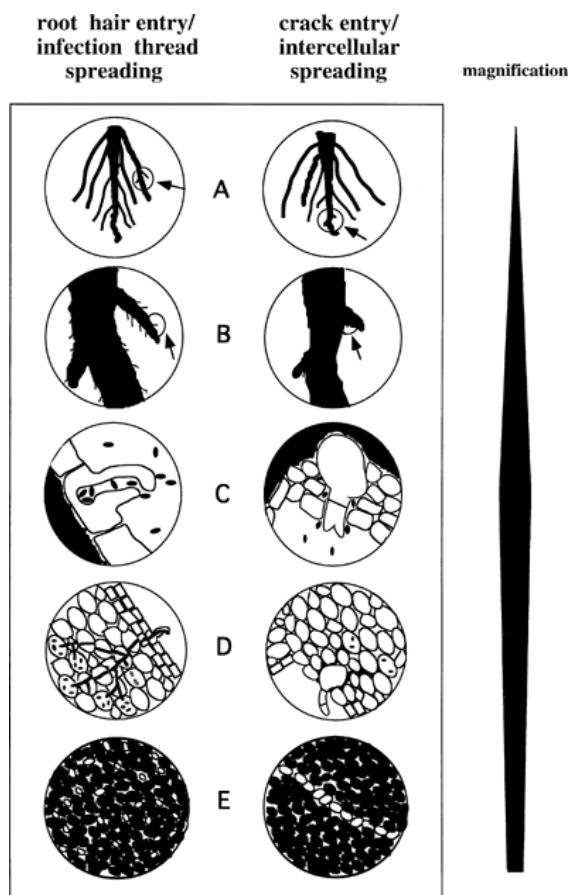
Kacang-kacangan menghasilkan senyawa aromatik yang mampu menginduksi struktur gen-Nod rhizobia melalui regulator NodD protein (van Rhijn dan Vanderleyden 1995; Göttfert 1993). Sebagian besar zat ini secara kolektif dikenal antara lain sebagai flavonoid; mereka termasuk isoflavon, chalcones, flavonol, flavon, dan antosianidin. Demikian pula coumarines dan betain memiliki aktivitas yang dapat menginduksi gen-Nod. Selain induksi gen-Nod, flavonoid juga memiliki peran ganda dalam beberapa tahapan perkembangan bintil (Miller *et al.* 1994) dan tanaman (Koes *et al.* 1994).

Sebagian besar strain *Bradyrhizobium* yang membentuk bintil pada kacang tanah mampu menggunakan produk degradasi flavonoid sebagai sumber karbon tunggal dan energi bebas. Setelah diinduksi dengan flavonoid oleh tanaman, bakteri mengkatalisis lipochitin-oligosakarida (faktor Nod). Pada gilirannya, faktor Nod menimbulkan berbagai respons pada akar, termasuk depolarisasi membran sel rambut akar, deformasi akar rambut, mengeritingnya rambut akar, pembentukan benang pra-infeksi, awal transkripsi gen nodulin, meningkatnya biosintesis flavonoid, pembelahan sel kortikal akar, dan kadang-kadang bahkan pembentukan bintil (van Rhijn dan Vanderleyden 1995; Spaink 1995).

Infeksi

Ada dua cara infeksi rhizobium untuk membentuk bintil pada akar kacang-kacangan (Uheda *et al.* 2001) yaitu infeksi melalui rambut akar (*root hair entry*) dan melalui celah (*crack entry*). Infeksi melalui rambut akar terjadi pada sebagian besar kacang-kacangan, termasuk kedelai, sedangkan infeksi melalui celah hanya terjadi pada beberapa kacang-kacangan termasuk kacang tanah. Perbedaan cara infeksi melalui rambut akar dan infeksi melalui celah ditunjukkan secara skematik pada Gambar 1.

Proses infeksi rhizobium pada tanaman leguminosa umumnya terjadi dalam empat tahap pra infeksi, yaitu kolonisasi rhizobia di daerah rizosfer, penempelan di permukaan akar, penyabangan rambut akar dan pembengkakan rambut akar. Pada tanaman kacang tanah infeksiya berbeda karena rambut-rambut akar yang normal tidak dijumpai. Akan tetapi bentuk menyerupai jumbai sering ditemukan pada bagian sambungan axil akar. Pada axil akar tersebut akan terbentuk akar lateral, dan pada akar lateral terjadi bintil. Bakteri rhizobium masuk ke dalam akar melalui pangkal akar lateral, karena pada tempat munculnya akar lateral tersebut terjadi patahan di epidermis dan korteks sehingga membentuk celah yang dapat dimasuki oleh bakteri rhizobium. Oleh karena itu bintil akar pada kacang tanah hanya berkembang pada tempat munculnya akar lateral (Uheda *et al.* 2001; Tajima *et al.* 2008). Selama proses ini berlangsung tidak terjadi benang infeksi yang dibentuk oleh rambut akar, sehingga rambut akar dianggap tidak berperan dalam proses infeksi pada kacang tanah.



Gambar 1. Tahapan dari dua cara infeksi rhizobium: melalui rambut akar/penyebaran benang infeksi, dan infeksi melalui celah/penyebaran interseluler.

Sebelah kiri (L): infeksi melalui rambut akar (misalnya, kedelai); sebelah kanan (R): infeksi melalui celah: (kacang tanah). (A) Sistem akar primer dan lateral (L dan R). (B) Rambut akar yang normal (L) dan rambut akar axiler (R). (C) Infeksi lewat rambut akar (L) dan infeksi lewat celah (R) (D) Penyebaran benang infeksi (L) dan penyebaran interseluler (R). (E) Bagian yang terinfeksi, dengan sedikit sebaran sel-sel yang tidak terinfeksi (L) dan dengan serangkaian sel-sel yang tidak terinfeksi (R) (Boogerd dan van Rossum 1997).

Perkembangan dan Struktur Bintil Akar

Bakteri rhizobium setelah masuk ke dalam akar menempati ruang di antara dinding rambut akar dan sambungan epidermal dengan sel-sel korteks. Sel-sel yang berbatasan memisah di lamela tengah, dan menghasilkan ruang yang terisi oleh bakteri, membentuk zone infeksi interseluler. Bakteri kemudian masuk ke lapisan sel yang lebih dalam, dan di tempat tersebut infeksi intraseluler terjadi. Bakteri yang memasuki sel diselubungi oleh membran. Setelah infeksi intraseluler terjadi, bakteri secara cepat memperbanyak diri. Perkembangan bintil terjadi melalui pembelahan berulang-ulang dari sel-sel tanaman inang yang terinfeksi. Masing-masing anak sel inang mengandung beberapa rhizobia. Pada saat sel inang berhenti membelah, bakteri berubah menjadi bentuk bakteroid, perubahan ini disertai dengan perubahan metabolisme (Nambiar 1988; Tajima *et al.* 2008).

Bintil akar kacang-kacangan terdiri dari dua jenis, yaitu determinat dan indeterminat, berdasarkan pada periode pertumbuhan bintil. Bintil determinat berbentuk bulat, sedangkan bintil indeterminat memiliki sumbu dan memanjang dengan meristem pada bagian apikal dari bintil (Puppo *et al.* 2005). Bintil akar kacang tanah termasuk tipe determinat (Stalker 1997). Lapisan yang tidak terinfeksi mengatur difusi oksigen ke bagian dalam bintil, yang merupakan fitur sangat penting untuk penambatan nitrogen (Serraj *et al.* 1999). Struktur tipis dan sederhana dari zona perifer dari bagian yang tidak terinfeksi dalam bintil kacang tanah meningkatkan kemungkinan difusi oksigen akan mudah terpengaruh oleh tekanan lingkungan, sehingga mengurangi kemampuan penambatan nitrogen (Tajima *et al.* 2008). Namun Sinclair dan Serraj (1995) dari hasil penelitiannya pada beberapa tanaman kacang-kacangan menyimpulkan bahwa tekanan penambatan nitrogen akibat cekaman kekeringan pada kacang tanah lebih rendah dibanding pada kedelai. Meskipun kedelai memiliki tiga zona perifer, namun bintil kacang tanah dengan zona perifer tipis dan sederhana, diduga memiliki mekanisme tertentu untuk melindungi penambatan nitrogen, bahkan di bawah tekanan eksternal.

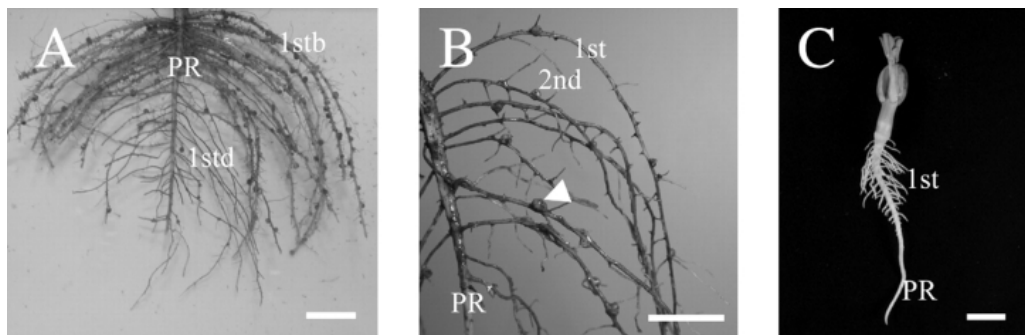
Perubahan biokimia dalam bakteroid menghasilkan sistem enzim yang diperlukan untuk penambatan nitrogen. Pada saat ini leghemoglobin dibentuk untuk melindungi enzim nitrogenase yang labil terhadap O_2 , dan pada waktu yang sama menyediakan O_2 untuk aktivitas respirasi bakteroid. Leghemoglobin bukan bagian dari enzim nitrogenase melainkan pengendali oksigen yang diperlukan untuk mengaktifkan enzim tersebut. Perkembangan bintil mulai terlihat pada umur 10–14 hari setelah tanam pada kondisi rumah kaca dan media bebas N, pada kondisi lapang biasanya terlihat pada umur 21–28 hari setelah tanam. Perkembangan bintil yang maksimum ditentukan oleh bobot dan volumenya, dan umumnya terjadi pada akhir fase pembungaan (Nambiar 1988; Uheda *et al.* 2001).

Macam dan Distribusi Bintil Akar

Bintil bervariasi dalam bentuk, warna, ukuran, tekstur dan lokasi. Bentuk dan lokasi bintil ditentukan oleh tanaman inangnya. Menurut Tajima *et al.* (2006) dalam sistem perakaran pada fase berbunga hingga pengisian polong, perkembangan bintil akar kacang tanah terbatas pada akar lateral, namun terkadang, bintil juga terjadi pada akar tunggang, atau pada akar lateral kedua. Pada kacang tanah bintil akarnya berbentuk bulat seperti bola, bintil yang efektif berukuran besar dan terletak di perakaran tanaman bagian atas. Sebaliknya, bintil yang tidak efektif ukurannya kecil, dalam jumlah banyak dan tersebar di seluruh perakaran tanaman inangnya. Sistem perakaran dan sebaran bintil akar pada kacang tanah disajikan pada Gambar 2.

Pada tanaman kacang tanah tipe Virginia bintil akarnya banyak terdapat di bagian hipokotil, sebaliknya pada tipe Spanish dan Valencia hanya membentuk sedikit bintil pada hipokotil. Pembintilan hipokotil dilaporkan memberikan sumbangan besar bagi penambatan nitrogen. Penelitian yang dilakukan pada kultivar Virginia Kadir 71–1 pada umur 70 hari setelah tanam menunjukkan bahwa 50% aktivitas nitrogenase berasal dari bintil yang terdapat pada hipokotil (Nambiar 1988).

Hubungan simbiosis yang efektif dapat diketahui dengan membelah bintil pada periode awal pembungaan, dan diamati warnanya. Bintil yang efektif berukuran besar dan mempunyai warna merah cerah di bagian dalam. Pigmen merah adalah leghemoglobin yang menunjukkan penambatan nitrogen secara aktif.



Gambar 2. Akar tunggang kacang tanah.

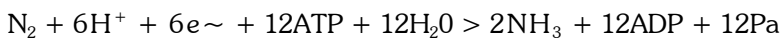
(A) Sistem akar tunggang kacang tanah yang tumbuh di lapang pada fase pengisian polong (B) Akar tunggang pada fase berbunga (C) Kecambah kacang tanah (5 HST). PR: akar utama (primary root); 1stb: akar lateral pertama yang terbentuk pada bagian basal akar utama; 1std, akar lateral pertama yang terbentuk pada bagian distal akar utama; 2nd, akar lateral kedua; tanda panah: bintil akar. Bar skala: (A, B) = 50 mm; (C) = 10 mm. (Sumber: Tajima *et al.* 2008).

PENAMBATAN NITROGEN

Reaksi Penambatan Nitrogen

Reaksi penambatan nitrogen udara terjadi pada bakteroid melalui sistem enzim yang disebut nitrogenase. Produk utama penambatan nitrogen adalah NH_4^+ . Enzim nitrogenase terdiri dari dua jenis protein, yaitu protein molibdenum-besi-belerang (Mo-Fe-S) dan protein besi (Fe). Masing-masing protein tidak aktif apabila berdiri sendiri. Protein molibdenum-besi-belerang (protein Mo-Fe-S) mengandung 1–2 atom molibdenum, 18–24 atom besi dan atom belerang yang labil terhadap asam, jumlahnya sama dengan atom besi.

Aktivitas penambatan nitrogen dalam bintil akar dipengaruhi oleh difusi oksigen ke bagian dalam bintil dan oleh partisi fotosintat dari tanaman untuk bintil melalui akar. Enzim nitrogenase memerlukan ATP dan reduktan bertegangan rendah. Fotosintat dari daun disalurkan ke akar dan setelah berada di dalam bintil akar, fotosintat tersebut dioksidasi oleh bakteri untuk menyediakan energi dan reduktan yang diperlukan. Dalam proses penambatan N_2 udara, Feredoksin tereduksi berperan sebagai donor elektron, dan diperlukan enam elektron untuk mereduksi satu molekul N_2 menjadi 2NH_3 . Reaksi penambatan N_2 adalah sebagai berikut:



Biosintesis sistem nitrogenase dikendalikan oleh represi genetika. Sintesis enzim tersebut menjadi tertekan apabila banyak terdapat NH_3 , jadi penambatan nitrogen hanya terjadi apabila produk penambatan tersebut diperlukan. Amonium yang dihasilkan oleh enzim nitrogenase di dalam bakteroid selanjutnya diasimilasi dengan segera oleh enzim-enzim tanaman inangnya.

Pola Aktivitas Penambatan Nitrogen

Aktivitas penambatan nitrogen pada tanaman leguminosa pada umumnya membentuk pola tertentu yang konsisten dengan fase pertumbuhan tanaman. Pada kacang tanah aktifitas penambatan nitrogen mulai pada umur tanaman sekitar 25–30 hari dan mencapai maksimum pada saat mendekati fase akhir pertumbuhan tanaman, selanjutnya menurun. Jenis tanaman leguminosa yang sama menunjukkan pola yang sama, meskipun berada

pada kondisi lingkungan yang berbeda. Sebaliknya, awal perkembangan bintil bervariasi menurut lokasi, tetapi waktu pembintilan mencapai maksimum tetap konsisten dengan fase pertumbuhan tanaman (Nambiar 1988).

Pada tanaman kacang tanah, kandungan leghemoglobin dalam bintil mencapai maksimum pada fase pengisian polong, kemudian menurun namun masih cukup tinggi hingga tanaman dipanen. Demikian pula dengan bobot kering akar dan daun meningkat hingga mendekati akhir pertumbuhan tanaman, sedangkan kandungan nitrogen daun mencapai maksimum pada dua bulan pertama setelah tanam, selanjutnya menurun.

FAKTOR-FAKTOR YANG MEMPENGARUHI PEMBINTILAN DAN PENAMBATAN N₂

Keberhasilan penggunaan rhizobium dalam meningkatkan pertumbuhan dan produksi kacang tanah antara lain ditentukan oleh mikrosimbion (rhizobium), makrosimbion (tanaman leguminosa), dan lingkungan. Kecocokan antara makro dan mikro simbion sehingga menjadi hubungan yang efektif atau tidak, sangat ditentukan oleh faktor lingkungan. Fase paling kritis yang menentukan berhasil tidaknya strain yang diinokulasikan adalah pada periode antara waktu tanam dan waktu munculnya akar dari benih. Kondisi lingkungan pada periode tersebut mempengaruhi pertumbuhan, kolonisasi rhizosfer, infeksi, dan ketahanan hidup rhizobium setelah infeksi. Faktor lingkungan mempengaruhi semua aspek pembintilan dan penambatan nitrogen, dalam beberapa kasus mengurangi kelangsungan hidup rhizobium dan keragamannya di dalam tanah; mempengaruhi pembintilan atau penambatan nitrogen dan bahkan pertumbuhan tanaman inang. Faktor lingkungan yang paling dominan dalam menentukan efektivitas simbiosis rhizobium dengan leguminosa adalah faktor fisik, kimia, dan biologi.

Faktor Fisik

Faktor fisik yang sangat mempengaruhi pembintilan dan penambatan nitrogen antara lain kelembaban, suhu, dan cahaya. Kelembaban yang terlalu tinggi maupun terlalu rendah dapat merugikan simbiosis antara tanaman leguminosa dengan bakteri rhizobium. Daya hidup rhizobium menurun secara cepat pada kondisi kekeringan, dan ini diperberat oleh siklus pembasahan dan pengeringan.

Kekeringan

Kekeringan dapat menyebabkan kegagalan infeksi sehingga tidak terjadi pembintilan. Kekeringan sangat menekan penambatan nitrogen disebabkan oleh hilangnya kelembaban dari bintil dan terhambatnya fotosintesis. Kulkarni *et al* (1988) melaporkan kekurangan air pada kacang tanah menurunkan luas daun dan produksi bahan kering, sehingga penyediaan karbon untuk pertumbuhan dan perkembangan bintil menjadi terbatas. Kurangnya kelembaban tanah sering kali berhubungan dengan tingginya suhu tanah. Kekeringan menurunkan jumlah rhizobium dalam tanah, menghambat pembintilan dan penambatan nitrogen. Kekeringan berkepanjangan akan mendorong kerusakan bintil. Perakaran yang dalam dapat menambang kelembaban pada lapisan tanah yang lebih dalam dan membantu kelangsungan penambatan nitrogen pada kondisi tanah yang kering. Infeksi mikoriza dilaporkan mampu meningkatkan toleransi tanaman terhadap kekeringan. Mikoriza merupakan asosiasi simbiotik antara jamur dengan akar tanaman.

Temperatur

Temperatur tanah yang tinggi sangat mempengaruhi infeksi bakteri dan penambatan nitrogen pada beberapa spesies kacang-kacangan, termasuk kacang tanah (Michiels *et al.* 1994). Suhu kritis bagi penambatan nitrogen untuk kacang tanah berkisar antara 35–40 °C. Suhu maksimum ketahanan hidup untuk *Bradyrhizobium japonicum* dilaporkan berkisar antara 33,7–48,7 °C (Kulkarni *et al.* 2000). Dalam studi sebelumnya dengan kacang tanah, beberapa strain *Bradyrhizobium* dihambat oleh suhu akar yang tinggi sehingga pembintilan serta fungsi bintil berkurang (Brockwell *et al.* 1995). Juga dilaporkan bahwa simbiosis kacang tanah-*Bradyrhizobium* benar-benar dihambat oleh suhu akar 40 °C karena kegagalan pembintilan dan ketidakmampuan bintil berfungsi (Kishinevsky *et al.* 1992). Suhu akar 37 °C yang berkelanjutan menurunkan fungsi bintil, penambatan nitrogen dan pertumbuhan tanaman. Suhu pada saat tanam sering melebihi 33 °C, sehingga efek merugikan dapat dilihat tidak hanya pada kelangsungan hidup rhizobium yang diinokulasikan, tetapi juga pada proses pembintilan. Menurut Homchan (1989), suhu tinggi pada keadaan tanah yang lembab menyebabkan kematian bakteri lebih cepat daripada suhu tinggi pada keadaan tanah yang kering. Inokulan basah lebih peka terhadap suhu tinggi daripada inokulan kering.

Cahaya

Intensitas cahaya mempengaruhi pembintilan dan penambatan nitrogen. Efek ini dapat dilihat pada tanaman leguminosa yang tumbuh di bawah naungan, dan yang ditanam pada kepadatan populasi yang tinggi. Naungan mengurangi penambatan nitrogen, sebaliknya penambahan cahaya meningkatkannya. Tanaman kacang-kacangan yang tumbuh di bawah naungan, misalnya pada tumpangsari dengan ubi kayu atau jagung akan menurun aktivitasnya dalam penambatan nitrogen. Berkaitan dengan kebutuhan cahaya maka panjang hari juga mempengaruhi pembintilan, pembentukan bintil lebih banyak dan lebih besar terjadi pada hari panjang daripada hari pendek. Hal ini menunjukkan adanya efek langsung fotosintesis pada simbiosis.

Faktor Kimia

Selama proses pembintilan ada dua kondisi yang berkaitan dengan penyediaan unsur hara untuk rhizobium. Kondisi pertama, terjadi selama fase infeksi ketika rhizobium terletak di luar sel tanaman. Pada fase ini bakteri secara aktif tumbuh dan membelah diri, dan sepenuhnya tergantung pada ketersediaan unsur hara di luar sel tanaman. Kekurangan hara esensial pada fase ini dapat membatasi terbentuknya bintil akar. Kekurangan Ca pada fase ini dilaporkan menghambat pembintilan terutama pada tanah masam. Kondisi kedua terjadi setelah rhizobium masuk ke dalam sel-sel korteks. Di dalam sel tanaman ini rhizobium tergantung sepenuhnya pada penyediaan hara dari tanaman inang. Berfungsinya bintil memerlukan unsur hara esensial meliputi P, S, Fe, Mo, dan Co. Bintil yang efektif mengandung unsur-unsur tersebut dalam kadar yang tinggi (O'Hara 2001).

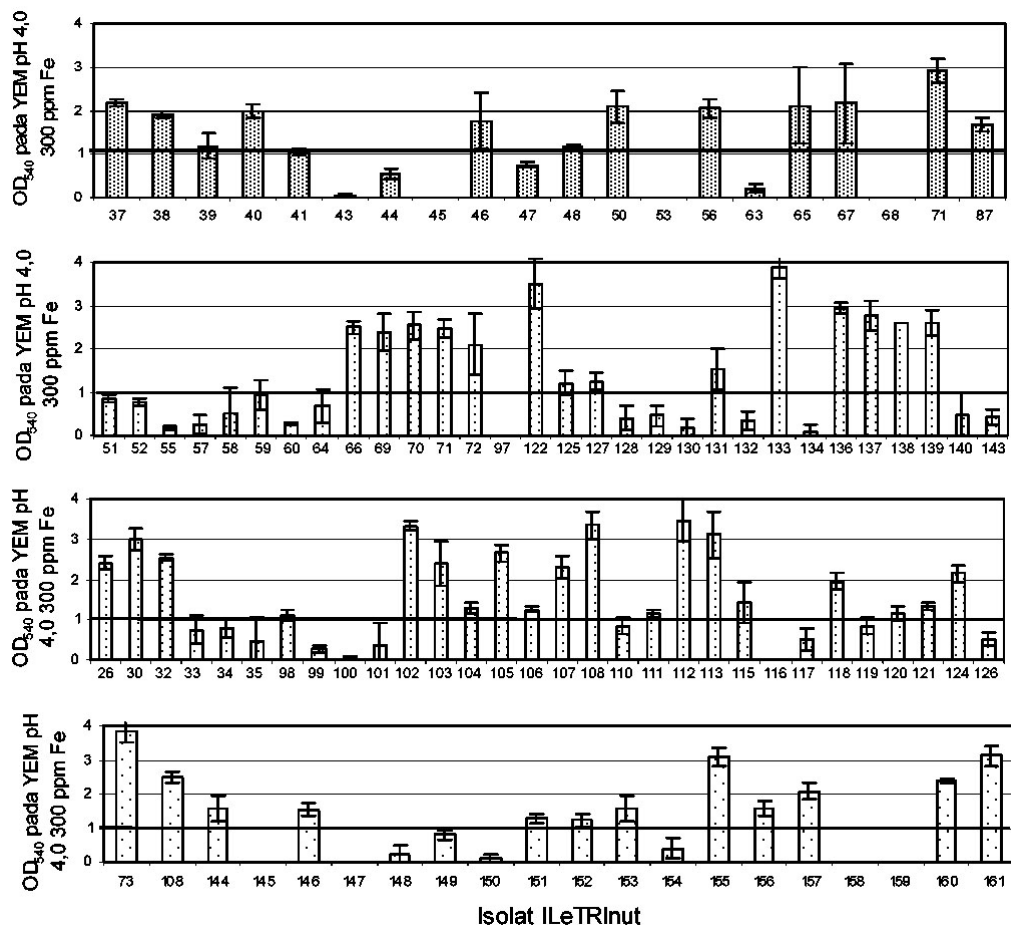
pH Tanah

Kemasaman tanah dan kaitannya dengan permasalahan kahat Ca, keracunan Al dan Mn menimbulkan pengaruh merugikan terhadap pembintilan dan penambatan nitrogen. Bintil yang dibentuk oleh rhizobium mungkin tidak menambat nitrogen atau laju penambatannya tidak memadai (Weisany *et al.* 2013). Kisaran pH optimal untuk rhizobium adalah sedikit di bawah netral hingga agak alkali. Pada pH tanah 5,0 beberapa strain

rhizobium masih dapat hidup, sedangkan pada pH 4,4 kebanyakan strain rhizobium tidak berkembang dalam tanah dan proses infeksi juga terhambat. Beberapa rhizobium sensitif terhadap pH yang rendah dan tidak dapat menginfeksi rambut akar pada tanah yang masam (Wolff *et al.* 1993). Komposisi dan struktur sel juga dapat menjadi faktor yang menyebabkan toleran dan tidaknya rhizobium terhadap pH rendah (Zahrán 1999). Kegagalan untuk pembintilan pada tanah masam, sebagian karena menurunnya jumlah rhizobia, atau sebab yang lain karena pH masam mempengaruhi pelekatan rhizobium pada akar.

Umumnya pH tanah selain berpengaruh langsung pada rhizobium, berkaitan pula dengan masalah ketersediaan hara tertentu yang mempengaruhi kehidupan rhizobium, infeksi rhizobium pada akar, persyaratan pH bagi tanaman, dan ketahanan hidup bakteri rhizobium. Spesies tanaman bervariasi dalam toleransi terhadap Al dan Mn, tetapi umumnya lebih peka dibanding rhizobium. Beberapa rhizobium toleran pada 100 M Al dan 300 M Mn, sementara pertumbuhan akar tanaman mulai terhambat. Balitkabi Malang melalui serangkaian kajian telah berhasil mengkoleksi isolat-isolat toleran masam, pH 4 dan kadar Fe 300 ppm (Gambar 3). Dari hasil kajian tersebut diperoleh 74 (58,73%) isolat ILeTRInut toleran pada kondisi masam berkadar Fe tinggi, sedangkan sisanya (47,27%) tidak toleran. Fenomena ini menunjukkan bahwa toleransi masing-masing isolat terhadap kondisi masam tanpa dan dengan 300 ppm Fe sangat beragam (Suchayono 2007).

Pada tanah Oxisol dan Ultisol yang memiliki pH kurang dari 5,0, penambahan nitrogen dapat sangat rendah, yang disebabkan oleh: konsentrasi H^+ , level toksik dari Al dan Mn, serta kahalat Ca, P dan Mo. Pemberian kapur dalam bentuk bubuk batu kapur atau dolomit dapat memperbaiki pertumbuhan tanaman dan bintil akar. Tanah biasanya dikapur mendekati netral, tetapi biaya dan ketersediaan batu kapur menghalangi pendekatan ini sehingga pengapuran umumnya hingga pH 5,5–5,8. Alternatif yang dapat membatasi efek negatif dari pH tanah adalah penggunaan strain inokulan dan varietas toleran masam, dan pelet (*coating*) benih yang telah diinokulasi rhizobium dengan lapisan bubuk batuan fosfat atau batu kapur. Kelangsungan hidup strain inokulan dan kinerjanya dalam meningkatkan produktivitas kacang-kacangan, sebagian ditentukan oleh kemampuannya untuk mengakses nutrisi/hara dari tanah, rizosfer dan akar tanaman inang (O'Hara 2001).



Gambar 3. Hasil bacaan kepadatan sel (optical density) dengan panjang gelombang 540 (OD_{540}) menggunakan spektrofotometer. Garis tebal menunjukkan batas toleransi isolat pada media YEM pH 4 berkadar 300 ppm Fe (Sumber: Sucahyono 2007).

Nitrogen (N)

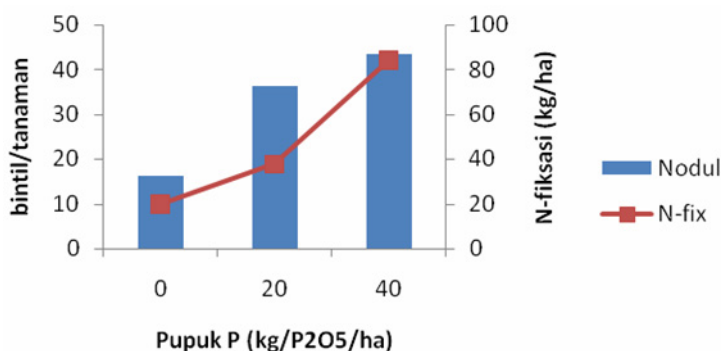
Senyawa nitrogen dalam tanah pada umumnya menunda atau menghambat pembintilan. Tanaman leguminosa meskipun sudah membentuk bintil lebih suka menggunakan nitrogen tanah yang telah tersedia. Adanya senyawa nitrogen menyebabkan bintil menjadi tidak aktif, tetapi segera berfungsi setelah nitrogen tanah tidak lagi tersedia (Anonim 1989, Fujikake *et al.* 2003). Pemupukan N dapat menguntungkan apabila penambahan sejumlah kecil pupuk N dapat merangsang pertumbuhan tanaman dan meningkatkan kemampuan fotosintesis tanpa akibat yang dapat menghambat pembentukan bintil akar. Oleh karena itu, pemberian pupuk N dalam jumlah kecil perlu dilakukan untuk merangsang pertumbuhan awal tanaman.

Fosfor (P)

Fosfor diperlukan untuk pembentukan bintil dan aktifitas bintil yang maksimal. Tanaman yang mendapatkan nitrogen secara simbiotik membutuhkan P dalam jumlah yang lebih besar daripada tanaman yang dipupuk N. Hal ini mungkin karena kebutuhan untuk

pengembangan bintil dan transduksi sinyal, serta membentuk P-lipid yang diperlukan untuk aktivitas bakteroid dalam bintil akar (Graham dan Vance 2000). Kandungan fosfor yang rendah dalam tanah dapat membatasi pertumbuhan populasi rhizobia dan perkembangan akar kacang-kacangan, yang pada gilirannya dapat mempengaruhi penambatan nitrogen (Kwari, 2005). Inokulasi ganda antara rhizobium dengan mikoriza berpengaruh sinergis pada pembintilan dan penambatan nitrogen pada tanah yang kahat P. Demikian pula penggunaan bakteri pelarut P dari genus *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Penicillium*, dan jamur *Aspergillus* dapat melarutkan batuan fosfat dan secara organik mengikat P-tanah (yang mengandung 95–99% total fosfat dalam tanah).

Yakubu *et al.* (2010) melaporkan bahwa pemberian pupuk P sebanyak 40 kg P₂O₅/ha meningkatkan jumlah bintil akar dan jumlah N yang ditambat sebesar 169% dibanding kontrol (Gambar 4).



Gambar 4. Pengaruh takaran pupuk P terhadap jumlah bintil dan N-fiksasi pada kacang tanah (Yakubu *et al.* 2010).

Molibdenum (Mo) dan Cobalt (Co)

Molibdenum dan Cobalt mempunyai peranan yang khusus dalam penambatan nitrogen. Keduanya berturut-turut adalah komponen nitrogenase dan makanan untuk rhizobium (Andrade *et al.* 2002). Tanpa adanya kedua unsur tersebut dalam jumlah yang memadai penambatan nitrogen tidak akan terjadi (Bailey dan Laidlaw 1999; Weisany *et al.* 2013). Kekurangan Co saja dapat menyebabkan terhambatnya sintesis DNA dan pembelahan bakteroid. Peran Co dalam penambatan nitrogen juga terkait dengan perannya sebagai kofaktor dari cobalamine (Vitamin B₆) yang berfungsi sebagai koenzim dalam proses penambatan nitrogen dan pertumbuhan bintil akar (Licht *et al.* 1996; Jordan dan Reichard 1998). Penggunaan Co pada takaran 16 mg/kg tanah meningkatkan secara signifikan jumlah dan bobot bintil, konsentrasi N dalam bintil, kadar leghaemoglobin, total produksi biomas, dan hasil biji dibanding tanpa perlakuan (Nasef *et al.*, 2008). Pemberian Co pada kacang tanah dengan takaran 50 mg/kg tanah meningkatkan jumlah bintil, chlorophyll “a”, chlorophyll “b” dan kandungan total chlorophyll (Jayakumar *et al.* 2009).

Data yang disajikan pada Tabel 1 menunjukkan respons parameter pembintilan kacang tanah yang dipengaruhi oleh kombinasi perlakuan Co dan Mo dalam berbagai tingkatan N (Gad 2012). Aplikasi Co dan Mo berperan penting dalam meningkatkan jumlah dan bobot bintil terutama pada 100% dan 75% N dibandingkan dengan kontrol pada 50 hari setelah tanam. Hasil ini sejalan dengan Balachandar *et al.* (2003) yang melaporkan bahwa Mo

dan Co secara signifikan meningkatkan jumlah bintil per tanaman dan biomasa bintil akar. Data pada Tabel 1 juga menunjukkan bahwa aktivitas nitrogenase meningkat sebesar 33,8% dengan kombinasi perlakuan Mo dan Co pada 50 hari setelah tanam dibandingkan dengan kontrol.

Tabel 1. Pengaruh level N dengan kombinasi Co dan Mo terhadap pembintilan dan penambatan N (aktivitas nitrogenase) pada kacang tanah umur 50 HST.

Level Nitrogen (%)	Jumlah bintil/tanaman	Berat kering bintil/tanaman (g)	Aktivitas N-ase ($\mu\text{mol C}_2\text{H}_4$ /g/jam)
25	100	0,98	10,2
50	108	1,19	12,3
75	118	1,77	12,9
100	125	1,86	14,8
Dengan Cobalt dan Molybdenum			
25	125	3,87	12,6
50	139	3,96	15,9
75	145	4,12	19,8
100	158	4,26	22,5

Sumber: Gad (2012).

Kekurangan Mo umumnya terjadi di tanah masam. Tanaman leguminosa berbiji besar seperti kacang tanah dan kedelai memerlukan Mo sebanyak 20–22 g/ha, dan dapat ditambahkan ke dalam larutan inokulan yang diaplikasikan ke biji. Karena itu sebagai golongan legum, tanaman kacang tanah sangat rentan terhadap defisiensi Mo bila ditanam di tanah masam. Hal ini mempengaruhi kemampuannya untuk nodulasi dan menambat nitrogen (Bailey dan Laidlaw 1999).

Faktor Biologi

Faktor biologi yang paling berpengaruh terhadap penambatan nitrogen oleh tanaman leguminosa adalah kompatibilitas antara tanaman inang dan bakteri rhizobium. Kompatibilitas antara rhizobium dengan tanaman inangnya dapat menghasilkan tiga kondisi yaitu (1) mampu membentuk bintil (infektif), (2) mampu menambat N_2 (efektif), dan (3) mampu menambat N_2 hingga memenuhi sebagian besar kebutuhan nitrogen tanaman (sangat efektif).

INOKULASI RHIZOBIUM

Pada umumnya populasi bakteri rhizobium dalam tanah kurang memadai dalam jumlah maupun kualitasnya. Pada kondisi yang demikian inokulasi benih atau tanah dengan kultur rhizobium yang efektif sangat diperlukan. Strategi utama untuk meningkatkan penambatan N simbiosis adalah dengan inokulasi rhizobium. Inokulasi diperlukan bila rhizobium yang ada dalam tanah tidak kompatibel/sesuai dengan jenis kacang-kacangan yang akan ditanam, tidak efektif atau jumlahnya tidak memadai (Brockwell *et al.* 1995; Catroux *et al.* 2001).

Keuntungan inokulasi antara lain: (a) menyediakan N, (b) meningkatkan hasil tanaman terutama pada tanah yang kadar nitrogennya rendah, dan (c) memperbaiki kualitas protein. Namun penerapan inokulasi rhizobium seringkali tidak dapat menghasilkan pengikatan nitrogen udara secara efisien. Keberhasilan inokulasi sering dibatasi oleh beberapa faktor, termasuk kondisi lingkungan, jumlah sel infeksi yang diaplikasikan, kehadiran mikroorganisme tanah pesaing lainnya, kekeliruan penerapan dari inokulan komersial dan kualitas inokulan (Maier dan Triplett 1996; Vlassak dan Vanderleyden 1997; Kyei-Boahen *et al.* 2002).

Beberapa hal yang perlu diperhatikan pada inokulasi dengan rhizobium antara lain:

- kondisi tanah tempat bertanam, meliputi kondisi fisik, kimia dan biologi tanah yang menentukan efektivitas hubungan simbiosis antara bakteri *Rhizobium* dan tanaman inangnya,
- kualitas inokulan yang digunakan,
- metode inokulasi dan faktor-faktor yang mempengaruhi keberhasilan inokulasi. Kondisi yang tidak optimal menyebabkan inokulasi kurang efektif.

Kualitas Inokulan yang Efektif

Inokulan yang efektif mengandung rhizobium yang mampu menghasilkan bintil yang efektif pada tanaman inangnya. Inokulan yang efektif dapat terdiri dari satu strain (inokulan unistrain) atau beberapa strain (inokulan multistrain). Inokulan unistrain sebaiknya digunakan pada kondisi tanah dan iklim setempat yang biasa ditanami varietas atau genotipe kacang-kacangan tertentu. Inokulan multistrain digunakan pada daerah yang biasa ditanami dengan bermacam-macam varietas kacang-kacangan, dan keragaman tanah serta iklimnya luas.

- Inokulan memberikan sejumlah besar rhizobium hidup, sekurang-kurangnya sepuluh ribu sampai satu juta per benih.
- Media pembawa (karier) dapat melindungi rizobia selama dalam paket dan setelah diaplikasikan ke benih, mudah diaplikasikan dan melekat baik pada benih.
- Inokulan bebas dari bakteri lain atau yang mungkin merugikan rhizobium atau tanaman inangnya.
- Paket inokulan memungkinkan pertukaran gas dan kelembaban di dalamnya.

Metode Inokulasi

Secara umum terdapat dua metode inokulasi, yaitu inokulasi pada benih dan inokulasi pada tanah. Inokulasi benih adalah cara yang paling umum karena mudah pelaksanaannya dan biasanya efektif pada kondisi normal. Inokulasi pada tanah dilakukan apabila tanah dalam keadaan kering dan panas, tanah dengan kemasaman tinggi, tanah mengandung populasi rhizobium alam yang tinggi namun tidak efektif, dan benih diperlakukan dengan bahan kimia yang ber

acun bagi rhizobium. Pada kacang tanah, perlakuan langsung dengan inokulan mungkin akan menghambat perkecambahannya karena benihnya rapuh. Menurut Anonim (1989), inokulasi yang terbaik pada kacang tanah adalah dengan mengaplikasikannya langsung ke tanah. Inokulan dicampur dengan air kemudian disiramkan ke dalam larikan sebelum tanam.

Keberhasilan inokulan rhizobium sangat ditentukan oleh kepekaannya terhadap lingkungan. Pada umumnya, kondisi yang paling merugikan adalah panas dan kekeringan.

Pada saat inokulan diaplikasikan ke benih atau disebarkan ke persemaian, kematian bakteri rhizobium mulai terjadi. Pada kondisi yang merugikan jumlah rhizobium yang mati dapat terus bertambah sampai benih berkecambah dan akar mulai muncul. Munculnya akar akan membantu rhizobium untuk berkoloni dan menginfeksi akar sehingga laju kematian rhizobium berkurang. Apabila perkecambahan terhambat atau tertunda, semakin banyak rhizobium yang mati. Sebaliknya rhizobium yang sudah berada di dalam tanah dari musim tanam sebelumnya lebih tahan hidup.

Hasil penelitian yang dilakukan antara lain pada kacang tanah dan kedelai, sebagian besar bintil akar dari inokulasi terdapat pada akar utama dan bukan pada cabang akar. Hal ini menunjukkan bahwa pergerakan rhizobium yang diinokulasikan dalam tanah terbatas. Bila dalam tanah terdapat populasi rhizobium yang tinggi dan benih diinokulasi dengan strain terseleksi, inokulasi sukses dengan menghasilkan peningkatan bintil akar pada pangkal akar utama (Hungria dan Bohrer 2000).

Kompatibilitas Rhizobium dengan Pestisida

Perlakuan benih dengan insektisida dan fungisida seringkali perlu dilakukan untuk melindungi benih dari serangga dan mikroorganisme tanah yang merugikan. Bahan kimia yang digunakan untuk perlakuan pendahuluan pada benih sebelum tanam umumnya tersusun atas satu atau beberapa logam berat seperti Hg, Zn, Cu, atau Pb yang bersifat racun untuk rhizobium dan tidak cocok dengan inokulasi. Pada umumnya bahan kimia dapat mematikan rhizobium padahal diperlukan sejumlah besar rhizobium hidup untuk menghasilkan pembintilan yang efektif. Oleh karena itu kompatibilitas atau ketahanan hidup rhizobium pada benih yang diberi bahan kimia sebelum ditanam (*seed treatment*) perlu mendapat perhatian.

Kompatibilitas antara inokulan rhizobium dengan fungisida berkaitan langsung dengan toleransinya terhadap fungisida tersebut (Revellin *et al.* 1993). Aplikasi fungisida carboxin dan carbendazim sebagai *seed dressing* atau diaplikasikan ke tanah berpengaruh terhadap penambatan nitrogen pada kacang tanah. Pada perlakuan *seed dressing*, carbendazim meningkatkan aktivitas nitrogenase (enzim penambat nitrogen) pada bintil akar, sedangkan carboxin menurunkannya. Namun bila diaplikasikan ke tanah, carboxin dan carbendazim meningkatkan aktivitas nitrogenase (Felaifel *et al.* 1991)

Penelitian untuk menguji kompatibilitas rhizobium dengan bahan kimia pada benih (*seed dressing*) banyak dilakukan, tetapi umumnya dilakukan pada tanah yang mengandung rhizobium alam yang mampu membentuk bintil dengan baik, sehingga hasilnya menjadi kurang tepat. Bahan kimia dalam pestisida kurang berpengaruh terhadap bakteri rhizobium yang sudah berada dalam tanah (Anonim 1989). Oleh karena itu untuk benih yang sudah diberi perlakuan bahan kimia (*seed treatment*) sebaiknya menggunakan inokulan yang diaplikasikan ke tanah.

Rhizobium Alam (Indigenous Rhizobium)

Rhizobium yang secara alami terdapat dalam tanah disebut sebagai rhizobium indigenous atau rhizobium alam. Tanah dengan kandungan populasi rhizobium indigenous yang rendah dapat terjadi pada daerah di mana tanaman kacang-kacangan yang berkaitan tidak tersedia/tumbuh, atau pada pH, tekanan osmotik, temperatur, logam berat yang merugikan bagi rhizobium (Catroux *et al.* 2001; Chemining'wa *et al.* 2011). Keberadaan populasi rhizobium indigenous dapat menjadi kendala bagi keberhasilan inokulasi. Tingginya populasi rhizobium alam dapat menentukan apakah tanaman akan tanggap

terhadap inokulasi atau tidak (Chemining'wa *et al.* 2011). Oleh karena itu sebelum melakukan inokulasi perlu mengenali rhizobium indigenous yang ada dalam tanah dan mengetahui pengaruhnya terhadap inokulasi rhizobium. Keberhasilan inokulasi akan diperoleh bila strain rhizobium yang digunakan mampu berkompetisi dan efektif dalam simbiosis (Brockwell *et al.* 1995).

Perlakuan inokulasi sebaiknya memperhitungkan populasi rhizobium yang ada di dalam tanah, seperti halnya apabila melakukan pengapuran, memperhitungkan pH tanah terlebih dahulu. Rhizobium alam yang ada di dalam tanah dapat dianggap seperti hara lainnya. Menurut Thies *et al.* (1991), rhizobium alam mempengaruhi inokulasi melalui dua cara yaitu kompetisi dan efektivitas. Salah satu sifat rhizobium yang paling menentukan dalam kompetisi adalah masa rhizobium per gram tanah. Beberapa percobaan inokulasi menunjukkan bahwa keberhasilan strain inokulan untuk membentuk bintil sangat tergantung pada jumlah kompetitornya yaitu rhizobium alam dalam tanah. Tanah yang sering ditanami kacang-kacangan pada umumnya mengandung populasi rhizobium lebih tinggi dibanding yang tidak pernah atau jarang ditanami kacang-kacangan (Bogino *et al.* 2006).

Rahmianna *et al.* (1991) melaporkan bahwa pada tanah yang sering ditanami kacang-kacangan, takaran inokulan menentukan keberhasilan inokulasi rhizobium pada tanaman kacang tanah. Inokulan yang diberikan sesuai dengan takaran anjuran tidak meningkatkan hasil polong, sedangkan pemberian inokulan sebanyak tiga kali takaran anjuran meningkatkan hasil sebanyak 10% dari hasil polong tanaman yang tidak diinokulasi. Berat bintil, tinggi tanaman dan berat segar brangkas tanaman meningkat seiring dengan peningkatan takaran inokulan rhizobium.

PENUTUP

Kacang tanah termasuk dalam kelompok tanaman “Cowpea cross inoculation”, yaitu kelompok di mana strain rhizobium yang menjadi pasangan simbiosis dari salah satu tanaman dapat menginfeksi tanaman lainnya dalam kelompok tersebut. Keistimewaan tersebut menyebabkan pembintilan secara alami pada tanaman kacang tanah lebih mudah terjadi. Pada sebagian besar kacang-kacangan proses infeksi atau masuknya rhizobium ke dalam akar adalah melalui rambut akar sedangkan pada kacang tanah melalui celah atau pangkal akar lateral sehingga rambut akar dianggap tidak berperan dalam proses infeksi pada kacang tanah. Efektivitas simbiosis tanaman dengan rhizobium sangat ditentukan oleh faktor lingkungan fisik, kimia, dan biologi.

DAFTAR PUSTAKA

- Andrade D.S., P.J. Murphy and K.E. Giller. 2002. Effects of liming and legume/cereal cropping on populations of indigenous rhizobia in acid Brazilian oxisol. *Soil Biol. Biochem.* 34:477–485.
- Anonim. 1989. *Legume Inoculation and Their Use*. NifTAL, FAO. Rome.
- Bailey, J.S., and A.S. Laidlaw. 1999. The interactive effects of phosphorus, potassium, lime and molybdenum on the growth and morphology of white clover (*Trifolium repens*) at establishment. *Grass and Forage Science*, 54:69–76.
- Balachandar, D., P. Nagarajan and S. Gunasekaran, 2003. Effect of organic amendments and micronutrients on nodulation and yield of blackgram in acid soil. *Legume Res.* 26(3):192–195.
- Bogino, P., E. Banchio, L. Rinodi, G. Cerioni, C. Bonfiglio and W. Giordano. 2006. Groundnut (*Arachis hypogaea*) response to inoculation with *Bradyrhizobium* sp. In soils of

- Argentina. Ann. Appl. Biol. 148:207–212.
- Booger, F.C., and D. van Rossum. 2006. Nodulation of groundnut by *Bradyrhizobium*: a simple infection process by crack entry. FEMS Microbiology Reviews. 21 (1):5–27.
- Brockwell, I., P.J. Bottomley, and J.E. Theis. 1995. Manipulation of rhizobia microflora for improving legume productivity and soil fertility: A critical assessment. Plant and Soil 174:143–180.
- Catroux G., A. Hartmann and C. Revelin. 2001. Trends in rhizobial inoculant production and use. Plant and Soil 230, 21–30.
- Chemining'wa, G.N., S.M.W. Theuri and J.W. Muthomi. 2011. Abundance of indigenous rhizobia nodulating cowpea and common bean in Central Kenyan soils. Afr. J. Hort. Sci. 5:92–97.
- Downie, J.A. 1994. Signalling strategies for nodulation of legumes by rhizobia. Trends Microbiol. 2, 319–324.
- Felaifel, M.S.A. 1991. Toxicological studies on certain fungicides. Ph.D. Thesis Fac. of Agric. Zagazig Univ. 152 pp.
- Fujikake, H., A.Yamazaki, N. Ohtake, K. Sueyoshi, S. Matsushashi, T. Ito, C. Mizuniwa, T. Kume, S. Hashimoto, N.S. Ishioka, S. Watanabe, A. Osa, T. Sekine, H. Uchida, A. Tsuji and T. Ohyama. 2003. Quick and reversible inhibition of soybean root nodule growth by nitrate involves a decrease in sucrose supply to nodules. Journal of Experimental Botany, 54 (386): 1379–1388.
- Gad, N. 2012. Response of Groundnut (*Arachis hypogaea*) Plants to Cobalt and Molybdenum Mixture. Middle East Journal of Agriculture Research, 1(1):19–25.
- Giller, K. E. 2001, Nitrogen Fixations in Tropical Cropping Systems 2nd ed. CAB International. Willingford, Oxen, UK. 323 pp.
- Graham, P.H. and C.P Vance. 2000. Nitrogen fixation in perspective, an overview of research and extension needs. Field Crops Res. 65:93–106.
- Göttfert, M. 1993. Regulation and function of rhizobial nodulation genes. FEMS Microbiol. Rev. 104:39–64.
- Homchan, J. 1989. Environmental Constraint to Nitrogen Fixation and Rhizobial Survival. Lecture presented in BNF Training Course By FAO/DOA/NiFTAL. Bangkok, 6–31 March 1989.
- Hungria, M. and T.R.J. Bohrer. 2000. Variability of nodulation and dinitrogen fixation capacity among soybean cultivars. Biology and Fertility. 31:45–52.
- Jayakumar, K., C.A. Jaleel, M.M. Azooz, P. Vijayarangan, M. Gomathinayagam and R. Panneerselvam. 2009. Effect of Different Concentrations of Cobalt on Morphological Parameters and Yield Components of Soybean. Global J. of Molecular Sci. 4(1):10–14.
- Jordan, A. and P. Reichard. 1998. Ribonucleotide reductases. Annu Rev Biochem. 67:71–98.
- Kannenberg, E.L. and N.J. Brewin. 1994. Host–plant invasion by *Rhizobium*: the role of cell-surface components. Trends Microbiol. 2, 277–283.
- Kijne, J.W. 1992 The *Rhizobium* infection process. In: Biological Nitrogen Fixation. Stacey, G.S., H.J. Evans, and R.H. Burris. (Eds.). p. 347–398. Routledge, Chapman and Hall, New York, USA.
- Kishinevsky, B.D., D. Sen and R.W. Weaver. 1992. Effect of High Root Temperature on *Bradyrhizobium*-Peanut Symbiosis. Plant and Soil 143:275–282.
- Koes, R.E., F. Quattrocchio and J.N.M. Mol. 1994. The flavonoid biosynthetic pathway in plants. BioEssays 16, 123–132.
- Kulkarni, S., S. Surange and C. S. Nautiyal (2000). "Crossing the limits of *Rhizobium* existence in extreme conditions." Curr. Microbiol. 41:402–409.

- Kulkarni, J.H., V. Ravindra, V.K. Sojitra and D.M. Bhatt. 1988. Growth, nodulation and N uptake of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) as influenced by water deficit stress at different phenophases. *Oleagineus*, 43:415–419.
- Kwari, J.D. 2005. Soil fertility status in some communities of southern Borno. Final report to PROSAB Project, Maiduguri, Nigeria. p. 21.
- Kyei-Boahen, S., A. E. Slinkard and F. L. Walley. 2002. Evaluation of rhizobial inoculation methods for chickpea. *Agronomy Journal*, 94:851–859.
- Licht, S., G.J. Gerfen and J. Stubbe. 1996. Thiel radicals in ribonucleotide reductases. *Science*, 271:477–481.
- Maier, R.J., and E.W. Triplett. 1996. Toward more productive, efficient, and competitive nitrogen- fixing symbiotic bacteria. *Critical Reviews in Plant Sciences* 15:191–234.
- Michiels, J., C. Verreth and J. Vanderleyden. 1994. Effects of Temperature Stress on Bean-Nodulating Strains. *Environ. Microbiol.* 60:1206–1212.
- Miller, K.J., J.A. Hadley and D.L. Gustine. 1994. Cyclic β -1,6-1,3-glucans of *Bradyrhizobium japonicum* . USDA 110 elicit isoflavonoid production in the soybean (*Glycine max.*) host. *Plant Physiol.* 104:917–923.
- Nambiar, P.T.C. 1988. Nodulation and nitrogen fixation. *In*:Groundnut. P.S. Redy (Ed.). Indian Council of Agricultural Research.
- Nasef, M.A., A.M. Abd El-Hameed, H.M. Salem and A.F. Abd El-Hamide. 2008. Efficiency of applied rates and methods of cobalt on growth, yield and elemental composition of peanut plants grown on a sandy soil. *Annals of Agricultural Science, Moshtohor* 42(2):851–860.
- O'Hara, G.W., N. Boonkerd and M.J. Dilworth. 1988. Mineral constraint to nitrogen fixation. *Plant and Soil*, 108:93–110.
- Puppo A, K. Groten, F. Bastian, R. Carzaniga, M. Soussi and M.M. Lucas. 2005. Nodule senescence: roles for redox and hormone signaling in the orchestration of the natural aging process. *New Phytologist*, 165:683–701.
- Rahmiana, A.A., A. Harsono and Suryantini. 1991. Studi Rhizobium pada kacang tanah. *Dalam Hasil Penelitian Kacang Tanah Di Daerah Tuban*. Balittan Malang.
- Revellin, C., P. Leterme and G. Catroudx. 1993. Effect of some fungicides seed treatments on the survival of *Bradyrhizobium Japonica* and on the nodulation and yield of soybean (*Glycin max*, L.) Merr.}. *Biology and Fertility of Soils*, 16:211–214. {c.f. *Rev. Pl. path.*, 73:3266}.
- Serraj R., T.R. Sinclair and L.C. Purcell. 1999. Symbiotic N₂ fixation response to drought. *Journal of Experimental Botany*, 50:143–155.
- Sinclair, T.R and R. Serraj. 1995. Legume nitrogen fixation and drought. *Nature*. 378:344.
- Spaink, H.P. 1994. The molecular basis of the host specificity of *Rhizobium* bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. 65:81–98.
- Spaink, H.P. 1995. The molecular basis of infection and nodulation by rhizobia: the ins and outs of symbiogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 33:345–368.
- Stalker, H.T. 1997. Peanut (*Arachis hypogaea* L.) Field Crops research. 53:205–217.
- Sucahyono, D. 2007. Toleransi isolat *Rhizobium* kacang tanah pada kondisi masam berkadar Fe tinggi. *Agritek*. 15:152–158.
- Tajima R., S. Morita and J. Abe. 2006. Distribution pattern of root nodules in relation to root architecture in two leading cultivars of peanut (*Arachis hypogaea* L.) in Japan. *Plant Production Science*. 9:249–255.
- Tajima, R., J. Abe, O. N.Lee, S. Morita and A. Lux. 2008. *Ann Bot.* 101(4):491–499.
- Thies, J.E., P.W. Singleton and B. B. Bohlool. 1991. Influence of the size indigenous rhizobial populations on establishment and symbiotic performance of introduced rhizobia on field-grown legumes. *Applied and Environmental microbiology*. 57 (1):19–28.
- Uheda E., H. Daimon and F. Yoshizako. 2001. Colonization and invasion of peanut (*Arachis hypogaea* L.) roots by *gusA*-marked *Bradyrhizobium* sp. *Canadian Journal of*

- Botany;79:733–738.
- van Rhijn, P. and J. Vanderleyden. 1995. The *Rhizobium*–plant symbiosis. Microbiol. Rev. 59, 124–142.
- Weisany, W., Y. Raei and K.H Allahverdipoor. 2013. Role of Some of Mineral Nutrients in Biological Nitrogen Fixation. Bull. Env. Pharmacol. Life Sci., Vol 2 (4):77–84.
- Vlassak, K. M. and J. Vanderleyden. 1997. Factors influencing nodule occupancy by inoculant rhizobia. Critical Reviews in Plant Sciences 16:163–229.
- Wolff ,A., P. Singleton, M. Sidirelli and B. Bohlool. 1993. Influence of acid soil on nodulation and interstrain competitiveness in relation to tannin concentrations in seeds and roots of *Phaseolus vulgaris*. Soil Biol Biochem. 25:715–21.
- Yakubu, H., J.D. Kwari and M.K. Sandabe. 2010. Effect of Phosphorus Fertilizer on Nitrogen Fixation by Some Grain Legume Varieties in Sudan –Sahelian Zone of North Eastern Nigeria. Nigerian Journal of Basic and Applied Science 18(1):19–26.
- Zahran, H.H. 1999. *Rhizobium-legume* symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions in arid climate. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 63:968–989.