

## **BAB 7**

### ***PERBINCANGAN***

## BAB 7

### PERBINCANGAN

Dalam kajian awal sitologi, biji benih *C. annuum* varieti MC 4 dan MC 5 dicambahkan di dalam tanah steril pada suhu  $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$  di bawah 16 jam cahaya dan 8 jam gelap. Tujuan eksperimen ini ialah untuk mendapatkan panjang piawai akar-akar dan umur anak cambah yang sesuai dari populasi seragam untuk digunakan dalam eksperimen-eksperimen seterusnya. Dalam eksperimen seterusnya akar dengan kepanjangan dan umur piawai yang telah ditentukan sahaja digunakan. Eksperimen ini dilakukan dalam keadaan aseptik untuk mengelakkan atau mengurangkan perbezaan di antara anak-anak cambah yang mungkin wujud dalam eksperimen-eksperimen berikutnya yang menggunakan sistem *in vitro*. Berdasarkan kajian awal ini, telah didapati bahawa anak cambah yang berumur 7 hari dengan panjang akar primernya  $21.20 \pm 0.84$  mm bagi var. MC 5 dan  $21.45 \pm 0.93$  mm bagi var. MC 4 adalah kepanjangan akar yang sesuai digunakan untuk eksperimen seterusnya. Kadar pemanjangan akar primer bagi *C. annuum* var. MC 5 ialah 4.19 mm/hari dan 4.18 mm/hari bagi var. MC 4. Purata panjang akar yang diperolehi secara aseptik ini digunakan sebagai panjang akar yang sesuai untuk kajian kultur tisu.

Biji benih yang dicambahkan tidak terus bercambah sehingga selepas 2 hari. Pada awalnya percambahan biji benih *C. annuum* var. MC 5 dan MC 4 adalah sangat perlahan (Rajah 3a dan 3b). Keadaan ini mungkin disebabkan kewujudan bahagian testa

yang merupakan pelindung semulajadi bagi biji benih. Proses percambahan dimulakan dengan pengambilan air oleh biji benih melalui proses rendaman dan diakhiri dengan permulaan pemanjangan pada bahagian embrionik iaitu radikel. Dalam kajian ini, biji benih direndam dalam air suling semalam. Jangkamasa merendam biji benih ini agak singkat kerana proses 'scarification' telah dilakukan dengan merendam dalam larutan natrium hipoklorik 5.0% (v/v) selama 10 minit. Walau bagaimanapun rendaman perlu juga dilakukan untuk menambahkan kadar pengambilan air oleh biji benih, meningkatkan kadar respirasi dan perkembangan mitokondria. Menurut Bewley dan Black (1985), peringkat merendam biji benih boleh membantu meningkatkan respirasi, aktiviti enzim dan organel serta sintesis protein di dalam biji benih. Terdapat 3 laluan respirasi dalam biji benih iaitu glikolisis, laluan pentos fosfat dan kitaran Krebs di mana ketiga-tiga laluan ini lebih aktif dalam biji benih yang direndam berbanding dengan biji benih kering. Apabila biji benih dikenakan air, gas oksigen dibebaskan dan keadaan ini dipanggil 'wetting burst' di mana berlaku untuk beberapa minit sahaja.

Apabila dormansi biji benih dipecahan dengan pengambilan air, maka perubahan proses metabolisme berlaku. Bahan simpanan dalam kotiledon digunakan untuk membina bahan yang merangsangkan percambahan. Selepas pengambilan air oleh biji, asid giberelik dari skutelum merangsangkan sintesis  $\alpha$ -amilase dan enzim hidrolitik lain. Fungsi enzim  $\alpha$ -amilase ialah menghidrolisis simpanan kanji iaitu polisakarida dan monosakarida kepada glukosa dan maltosa. Enzim lipase memecahkan lemak kepada gliserol dan asid lemak. Manakala enzim protease menghidrolisis protein kepada asid amino bersama-sama dengan triptofan yang penting untuk sintesis IAA. Hormon IAA berfungsi untuk

menggalakkan pemanjangan akar di mana sebaik sahaja testa pecah, biji benih mula bercambah.

Dalam kajian ini, selepas 2 hari percambahan bermula dengan kemunculan radikel diikuti oleh koleoptil. Percambahan berlaku pada ovul yang telah tersenyawa. Selepas persenyawaan, ovul terlibat dengan aktiviti mitosis yang giat dan tidak melibatkan perkembangan sel yang banyak. Bahagian integumen meneruskan perkembangannya secara pembahagian antiklin dan periklin. Pembahagian antiklin menyebabkan pemanjangan integumen dan pembahagian periklin meningkatkan ketebalan sel.

Percambahan biji benih *C. annuum* adalah jenis epigeal. Pada hari kelapan, akar sekunder mula muncul di mana ini akan mengganggu pemanjangan akar primer disebabkan wujud perkongsian bekalan nutrien. Akar bergantung secara heterotrofik kepada karbohidrat, vitamin tertentu dan hormon dari organ fotosintesis. Oleh itu, kehadiran akar sekunder akan mengganggu atau mempengaruhi pertumbuhan akar primer. Oleh kerana kajian ini hanya melibatkan aktiviti sel pada akar primer maka kehadiran akar sekunder perlu dielakkan. Berdasarkan Rajah 3, kadar pemanjangan akar *C. annuum* var. MC 5 ialah 4.19 mm/hari dan 4.18 mm/hari bagi var. MC 4. Keputusan eksperimen awal terhadap akar cili ini menunjukkan akar primer dengan kepanjangan piawai  $21.45 \pm 0.93$  mm (var. MC 4) dan  $21.20 \pm 0.84$  mm (var. MC 5) yang berumur 7 hari amat sesuai untuk digunakan dalam eksperimen seterusnya. Variasi di antara sel-sel akar yang memasuki fasa S dan mitosis boleh dikurangkan dengan memilih akar yang

mempunyai kepanjangan sama atau hampir sama dengan panjang akar piawai (Jakob dan Bovey, 1969). Menurut Bryant (1969) pula, terdapat perhubungan yang nyata di antara panjang akar dan indeks perlabelan serta indeks mitosis. Dengan menggunakan satu panjang akar piawai populasi yang seragam dalam perkembangannya boleh didapati. Pemilihan populasi akar yang seragam akan mengurangkan kadar variasi pada nilai indeks perlabelan dan indeks mitosis. Walau bagaimanapun peningkatan keseragaman sampel akar semasa sel-sel akar melengkapkan fasa S dan memasuki mitosis akan menyebabkan semua populasi sel dari G1 memasuki mitosis ( Thomas dan Davidson, 1981 ). Oleh sebab itu akar *C. annuum* var. MC 4 yang panjangnya di antara 18.40 mm dan 24.50 mm serta akar var. MC 5 yang panjangnya di antara 18.40 mm dan 24.04 mm diambil untuk kajian sitologi seperti pengiraan indeks mitosis, bilangan kromosom, pengukuran kandungan DNA nukleus, pengukuran purata luas sel dan nukleus serta masa penggandaan sel untuk mengurangkan variasi antara akar yang berbeza.

Nilai indeks mitosis (MI) bagi sel akar *C. annuum* var. MC 4 yang ditanam secara *in vivo* ialah  $20.56 \pm 1.95\%$  dan bagi var. MC 5 pula ialah  $22.11 \pm 1.26\%$ . Nilai MI diukur dari segmen akar di antara 0-2 mm pada meristem akar primer di mana jidal akar dibuangkan terlebih dahulu. Jidal akar perlu dibuangkan kerana bahagian ini hanya merupakan kumpulan sel yang berfungsi untuk melindungi meristem apeks akar dan memainkan peranan penting dalam pengawalan respons akar terhadap geotropisma. Zon pembahagian sel terletak di belakang jidal akar. Segmen 0-2 mm ini merupakan bahagian yang paling aktif melakukan pembahagian sel. Menurut Dewey dan Howard (1963), nilai MI akan berkurangan dengan pertambahan jarak dari meristem apeks akar. Sekiranya

segmen yang digunakan adalah 5mm dari hujung akar, maka sel yang melakukan pembezaan adalah lebih banyak dari sel yang melakukan pembahagian (Deeley *et al.*, 1957). Cardi *et al.*, (1993) juga telah menggunakan bahagian hujung akar untuk mengkaji ciri-ciri sitologi ke atas regenerasi *S. commersonii* yang diperolehi melalui teknik kultur tisu.

Purata bilangan kromosom yang diperhatikan dari sel akar yang ditanam secara *in vivo* bagi var. MC 4 ialah 24 dengan julat 21-25 dan bagi var. MC 5 juga 24 dengan julat 22-25. Bilangan kromosom diploid bagi *C. annuum* adalah  $2n = 24$  (Khan, 1976). Cili varieti tempatan ini merupakan spesies yang stabil di mana bilangan kromosomnya tidak berubah. Berdasarkan kepada eksperimen yang telah dilakukan, didapati saiz kromosom *C. annuum* kedua-dua vareiti MC 4 dan MC 5 adalah kecil dan slaid yang digunakan untuk pengiraan bilangan kromosom hendaklah benar-benar seragam atau tiada pertindihan kromosom. Kajian mengenai aktiviti sel *C. annuum* amat kurang dijalankan kecuali bilangan kromosom. Pengukuran luas sel dan nukleus merupakan parameter yang jarang dikaji terhadap spesies ini tetapi parameter ini penting untuk menentukan perhubungan di antara parameter saiz sel dan tempoh edaran sel (Thomas dan Davidson, 1983); perhubungan di antara saiz sel dengan potensi regenerasi ( Abu Shah dan Taha, 1994). Purata luas sel bagi sel profasa dari sel-sel akar *in vivo* var. MC 4 ialah  $261.43 \pm 6.56 \mu\text{m}^2$  dan purata luas nukleusnya adalah  $74.70 \pm 1.57 \mu\text{m}^2$ . Manakala purata luas sel bagi var. MC 5 pula ialah  $265.82 \pm 0.08 \mu\text{m}^2$  dan purata luas nukleusnya pula ialah  $69.82 \pm 4.5 \mu\text{m}^2$ .

Taburan kandungan DNA nukleus pada sel akar *in vivo* menunjukkan peratus sel poliploidi sebanyak 55.4% bagi var. MC 4 dan 71.3% bagi var. MC 5. Peratus sel-sel akar *C.annuum* var. MC 4 yang terdapat pada fasa G1 ialah 6.0%, fasa S, 19.3% dan fasa G2 ialah 19.3% juga. Bagi var. MC 5 pula nukleus pada fasa G1 ialah 5.3%, fasa S, 12.7% dan G2 hanya 10.7%. Tisu-tisu meristem akar selalunya adalah sel-sel diploid atau kandungan DNanya boleh berada antara  $2\text{C}$ - $4\text{C}$  bergantung kepada fasa mana ia berada iaitu G1 adalah  $2\text{C}$  tetapi G2 adalah  $4\text{C}$ . Berdasarkan kepada bilangan kromosom ke atas kedua-dua varieti MC 4 dan MC 5, tiada sel poliploidi didapati dalam keadaan *in vivo*. Walaupun peratus nukleus sel poliploidi adalah tinggi bagi kedua-dua varieti tetapi pemerhatian atau pengukuran ini dilakukan ke atas sel-sel pada peringkat interfasa sahaja dan berkemungkinan sel-sel ini belum memasuki fasa mitosis. Pengukuran kandungan DNA adalah berdasarkan integrasi ketumpatan optik cahaya (IOD) terhadap pewarna Feulgen. Dalam teknik ini, nukleus perlu diwarnakan dengan pewarna Feulgen dan dianggapkan kandungan DNA dalam nukleus adalah berkadar terus dengan nilai IOD ataupun nilai pewarna dengan syarat pewarna seperti Feulgen-Schiff digunakan. Berdasarkan kepada Van't Hof (1973, 74) populasi sel meristematik akan berhenti di fasa G1 dan G2 apabila proses pembahagian berhenti sementara, disebabkan faktor ketegangan atau pembezaan membentuk tisu matang. Woodard *et al.*(1961) mendapati sel yang berada 5 mm dari jidal akar *V.faba* berehat pada fasa G2 dan bergabung dengan tisu yang telah membeza di mana ini menyebabkan tisu matang akan mengandungi lebih banyak sel pada fasa G2.

Masa yang diambil oleh sel untuk menggandakan bilangan populasinya dalam keadaan *in vivo* ialah 24.83 jam (var. MC 4) dan 15.07 jam (var. MC 5). Ini bermakna bagi var. MC 4 satu sel anak mengambil masa lebih dari satu hari untuk sintesis sitoplasma dan organel, menambahkan isipadu nukleus atau saiz sel, memasuki mitosis dan membahagi sebelum menghasilkan sel baru. Walaupun begitu, bagi var. MC 5, masa penggandaan sel adalah lebih singkat iaitu 15.07 jam. Dalam kebanyakan tumbuhan peringkat tinggi, purata kadar pembahagian sel meristem apeks akar adalah satu hari (Clowes dan Juniper, 1968). Kenyataan ini adalah bersesuaian dengan masa penggandaan sel bagi *C.annuum* var. MC 4. Fujimura dan Komamine (1982) juga telah mendapati masa penggandaan sel bagi *Daucus* dalam kultur hanya 6 jam berbanding dengan 14 jam dalam keadaan 'intact'. Tempoh masa penggandaan sel adalah bergantung kepada jarak segmen dari hujung akar yang digunakan dan juga suhu. Contohnya Evans dan Savages (1959) telah mengukur Cdt bagi *Triticum* pada suhu 18°C dengan panjang apeks akar yang berbeza. Bagi segmen akar 0.15 mm dari hujung akar, nilai masa penggandaan sel atau Cdt adalah 21 jam dan seterusnya meningkat menjadi 60 jam bagi segmen akar 0.9 mm dari hujung akar. Dalam kajian ini, segmen akar yang digunakan hanya 2.0 mm dari hujung akar. Nilai masa penggandaan sel (Cdt) boleh digunakan untuk menganggar tempoh edaran atau kitaran sel. Nilai masa penggandaan sel (Cdt) akan menjadi sama dengan tempoh edaran sel sekiranya semua sel mengambil bahagian dalam edaran atau kitaran, tetapi biasanya hanya sebahagian sel yang mengambil bahagian dalam kitaran sel. Oleh itu selalunya didapati nilai masa penggandaan sel (Cdt) lebih panjang daripada tempoh edaran sel.

Aktiviti sel dalam akar cili yang ditanam secara *in vivo* merupakan asas rujukan untuk perbandingan dengan aktiviti sel yang berlaku dalam akar yang ditanam secara *in vitro*. Pemerhatian terhadap aktiviti sel dalam kedua-dua keadaan penting untuk mengenal pasti kehadiran variasi somaklon terutama pada peringkat sel. Sekiranya terdapat variasi dalam nukleus dan komposisi sel dalam sistem kultur tisu, maka ini akan menyebabkan kemungkinan berlakunya variasi somaklon apabila tisu tersebut menghasilkan tumbuhan lengkap. Jika komposisi sel di dalam kultur adalah stabil maka kemungkinan untuk regenerasi tumbuhan menyerupai tumbuhan induk atau penghasilan propagasi klonal adalah tinggi. Aktiviti sel meristem akar pada kedua-dua keadaan *in vivo* dan *in vitro* boleh dibanding dan dibezakan setelah media dan keadaan yang paling optima untuk regenerasi diketahui. Penentuan media tumbesaran optima adalah langkah utama dalam teknik kultur tisu. Pemilihan media yang dibekalkan dengan pelbagai hormon mewujudkan suatu pemerhatian yang menarik di mana respons yang ditunjukkan merupakan adaptasi eksplan dari keadaan *in vivo* kepada persekitaran *in vitro*. Media MS yang ditambah dengan beberapa kombinasi hormon iaitu 0.5 mg/l IAA dan 5.0 mg/l BA; 0.2 mg/l IAA; 0.3 mg/l IAA; 1.0 mg/l IAA dan 4.0 mg/l BA; 1.5 mg/l IAA dan 6.0 mg/l BA ( Jadual 6 ) adalah media yang paling responsif untuk menginduksikan regenerasi tumbuhan *C. annuum*.

Media MS tanpa hormon digunakan sebagai kawalan untuk mendapatkan regenerasi tumbuhan kerana ada setengah spesies tumbuhan boleh menghasilkan regenerasi di atas media tanpa hormon. Hujung pucuk terutamanya tisu meristematis pada bahagian apikal hujung dipercayai adalah tempat untuk sintesis auksin (Elliot,

1977). Auksin dipindahkan ke bahagian lain melalui floem. Oleh itu, apabila eksplan pucuk dikultur di atas media tanpa hormon sekalipun, ia masih boleh menghasilkan akar dengan kehadiran hormon endogenus.

Godbole *et al.*, (1984) telah melakukan kajian ke atas *Vigna aconitifolia* dan beliau telah mendapati eksplan pucuk berpotensi untuk regenerasi di atas media MS tanpa hormon. Keputusan ini menyokong pendapat yang menyatakan hormon endogenus memainkan peranan penting untuk regenerasi tumbuhan dari eksplan pucuk. Dalam kajian ini, eksplan pucuk yang dikultur di atas media MS tanpa hormon menunjukkan tumbesaran untuk beberapa ketika iaitu dua atau tiga daun baru muncul tetapi akhirnya tumbesaran terhenti. Eksplan yang berbeza menunjukkan respons yang berlainan di dalam kultur. Berdasarkan pemerhatian yang telah dilakukan terdapat empat jenis respons iaitu pembentukan kalus, pembentukan akar, pucuk berganda dan plantlet. Regenerasi tumbuhan lengkap diperolehi melalui pembentukan plantlet lengkap secara langsung dan pembentukan pucuk berganda. Eksplan petiol, batang dan pucuk yang dikultur di atas media MS yang ditambah dengan 0.2 mg/l IAA menghasilkan regenerasi langsung iaitu tanpa pembentukan kalus terlebih dahulu. Regenerasi tumbuhan lengkap *C. annuum* diperolehi melalui pembentukan pucuk berganda menggunakan media MS dengan kombinasi IAA dan BA iaitu 1.0 mg/l IAA dan 4.0 mg/l BA; 0.5 mg/l IAA dan 5.0 mg/l BA; 1.0 mg/l IAA dan 6.0 mg/l BA dan 1.5 mg/l IAA dan 6.0 mg/l BA. Kombinasi IAA dan BA pada kepekatan rendah menginduksikan kalus dan juga akar dalam *C. annuum* (Rujuk Jadual 6 dan Plat 3).

Eksplan batang, daun, petiol dan pucuk yang dikultur di atas media MS yang dibekalkan dengan 0.1 mg/l IAA menunjukkan respons yang sama iaitu pembentukan kalus. Respons yang sama diperhatikan apabila hormon BA ditambah sebanyak 0.5 mg/l; begitu juga respons eksplan-eksplan tersebut di atas media MS yang dibekalkan dengan 0.2 mg/l IAA dan 0.5 mg/l BA (Jadual 6). Kedua-dua hormon IAA dan BA hanya berupaya untuk menggalakkan pembahagian sel dan membentuk kalus tanpa pembentukan organ. Walau bagaimanapun pada kombinasi kepekatan IAA dan BA tertentu telah menginduksikan regenerasi tumbuhan lengkap. Jika kombinasi kepekatan IAA dan BA terlalu tinggi contohnya 0.9 mg/l IAA dan 0.9 mg/l BA, kesemua eksplan (batang, daun, pucuk dan petiol) hanya menginduksikan kalus sahaja. Narayanaswamy (1977) berpendapat bahawa semasa pembezaan tisu vaskular mungkin hormon tumbuhan (hormon endogenous) dihasilkan dan respons fisiologi tisu akan berubah bergantung kepada interaksi di antara hormon eksogenus dan persekitaran dalam tumbuhan. Penambahan hormon eksogenus akan mempengaruhi atau mengganggu tindakan hormon endogenous dari eksplan pucuk tumbuhan tersebut.

Eksplan batang yang dikultur di atas media MS yang ditambah dengan 0.2 mg/l IAA boleh menghasilkan regenerasi langsung iaitu melalui penghasilan plantlet (Plat 2c). Manakala eksplan daun pula, menghasilkan regenerasi tumbuhan melalui pembentukan pucuk berganda di mana kombinasi 0.5 mg/l IAA dan 6.0 mg/l BA; 1.0 mg/l IAA dan 4.0 mg/l BA dan 1.5 mg/l IAA dan 6.0 mg/l BA perlu ditambahkan kepada media MS. Berdasarkan kepada keputusan-keputusan yang diperolehi, didapati bahawa hormon

tumbesaran yang diperlukan oleh *C. annuum* var. MC 5 untuk menghasilkan regenerasi ialah IAA dan BA ( Jadual 6 ).

Walaupun begitu, Szasz *et al.*,(1995) telah berjaya memperolehi regenerasi tumbuhan *C. annuum* dari eksplan kotiledon dan hipokotil. Mereka telah menggunakan 2 genotip Italian dan 2 genotip Hungarian yang mana sebelum ini kedua-dua sumber eksplan tersebut merupakan tisu bukan responsif untuk regenerasi. Mereka telah menggunakan thidiazuron (TDZ) sebagai sumber sitokinin yang boleh mengubah proses regenerasi dari organogenesis kepada embriogenesis. Menurut Rao *et al.*,(1973), sekiranya eksplan daun dan batang dikultur di atas media MS dengan IAA dan BA, perkembangan akar akan direncat dan penghasilan tunas berlaku dengan pesat. Kombinasi hormon BA dan IAA adalah lebih efektif dalam pembezaan tunas pucuk berbanding dengan kombinasi BA dan NAA pada kultur batang dan daun *Physalis minima*. Situasi yang sama juga telah diperhatikan pada spesies *C. annuum* di mana Montero dan Alejo (1992) telah mendapati kombinasi hormon yang paling optima untuk penghasilan tunas dari hipokotil cili kultivar Chile de agua, Salvatierra dan Tampiqueno 74 ialah 5.0 mg/l BA dan 0.3 mg/l IAA yang ditambah kepada media MS.

Dalam kajian ini didapati selepas 7 hari di dalam kultur, saiz tisu-tisu tertentu pada eksplan batang, daun, petiol dan pucuk mula bertambah disebabkan penyerapan nutrien dan kemasukan hormon eksogenus melalui permukaan eksplan yang bersentuhan dengan media. Hasilnya ialah pembahagian sel secara berulang kali telah berlaku untuk menggantikan sel-sel yang luka, seterusnya membentuk sel-sel tidak terbeza (Yeoman *et*

*al.*, 1968). Kalus adalah tisu yang tidak terbeza dengan pembentukan sebilangan kecil tisu di bahagian tengahnya diinduksikan oleh hormon. Sekiranya kalus tersebut mempunyai keupayaan regenerasi yang tinggi, satu kelompok sel berwarna hijau akan dibentuk dan seterusnya akan menjadi primodia daun.

Menurut Lindsey dan Yeoman (1985) apabila berlaku kekurangan nutrien di dalam tumbuhan, perubahan tindakbalas biokimia dan struktur akan berlaku dan ini menyebabkan regenerasi organ. White (1967) telah mencadangkan bahawa organisasi permulaan dalam tumbuhan adalah respons kepada kecerunan cahaya, oksigen,  $\text{CO}_2$ , hormon, suhu dan tekanan fizikal. Oleh sebab itu aktiviti metabolismik sel-sel ini adalah hasil dari perhubungan atau kaitan di antara genom dan ransangan persekitaran.

Dalam kajian ini beberapa kombinasi IAA dan BA dengan kepekatan tertentu menginduksikan pembentukan pucuk berganda dari eksplan batang dan daun (Plat 7 dan 3). Selepas sebulan pucuk-pucuk berganda ini akan dipindahkan ke atas media yang mempunyai komposisi yang sama untuk mengelakkan kekurangan nutrien. Kartha *et al.*, (1981) berpendapat, pertambahan paras hormon endogenus yang disintesis oleh meristem akan mengganggu keseimbangan nisbah sitokin : auksin dalam seluruh tumbuhan. Oleh itu pembentukan pucuk berganda mungkin menyumbangkan penambahan hormon endogenus terutamanya sitokin di dalam kultur di mana tunas baru telah dikenalpasti sebagai tempat sintesis sitokin. Seterusnya ini akan meningkatkan paras sitokin yang mana akan mengganggu keseimbangan hormon dan menghalang perkembangan regenerasi. Situasi ini boleh diperbaiki dengan memisah dan

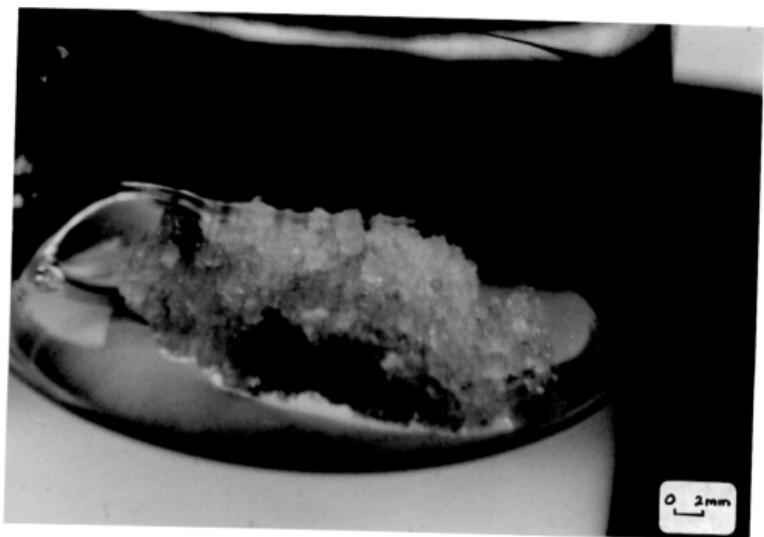


Plat 7 : Pembentukan pucuk berganda dari eksplan batang *C. annuum* yang dikultur di atas media MS yang dibekalkan dengan 0.5 mg/l IAA dan 5.0 mg/l BA selepas 3 minggu.

memindahkan pucuk-pucuk berganda ini ke dalam media baru. Regenerasi *C. annuum* secara langsung iaitu melalui pembentukan plantlet boleh didapati dari eksplan batang, petiol dan pucuk di atas media MS yang dibekalkan dengan 0.2 mg/l IAA dan 0.3 mg/l IAA. Peratus penghasilan plantlet dari eksplan batang dan pucuk adalah tinggi iaitu masing-masing 80%, tetapi eksplan petiol hanya 50%. Eksplan, batang, petiol dan pucuk menginduksikan plantlet di atas media MS yang ditambah dengan 0.2 mg/l IAA tetapi apabila eksplan yang sama dikultur di atas media MS dengan 0.3 mg/l IAA; hanya eksplan petiol sahaja boleh menghasilkan regenerasi (30%). Apabila media MS yang ditambah dengan 0.1 mg/l IAA dan 1.0 mg/l BA digunakan untuk mengkultur eksplan batang, daun, pucuk dan petiol, hanya akar dibentuk tanpa mengeluarkan tunas pucuk. Walaupun begitu, media ini tidak boleh digunakan untuk menginduksikan akar dari eksplan akar kerana ia akan menginduksikan kalus ( 50-55% ) dari eksplan akar. Akar yang diinduksikan dari eksplan akar di atas media MS yang dibekalkan dengan 0.2 mg/l IAA adalah lebih banyak ( 85% ) dan sihat ( Jadual 1 ). Selain daripada itu media MS yang ditambah dengan 0.1 mg/l IAA dan 0.5 mg/l BA dan media MS yang dibekalkan dengan 0.2 mg/l IAA serta 0.5 mg/l BA juga boleh menginduksikan akar tetapi peratus penghasilannya adalah rendah (30-62% , Jadual 1). IAA adalah hormon yang efektif untuk penghasilan akar bagi *C. annuum* varieti tempatan ini. Dalam kes ini, kepekatan auksin adalah lebih rendah daripada kepekatan sitokin . Kajian terhadap spesies lain seperti *Petunia inflata* dan *P. hybrida* oleh Rao *et al.*,(1973) mendapati NAA adalah hormon yang sesuai digunakan untuk penghasilan akar. Berdasarkan kajian Skoog dan Miller (1957), ke atas kalus tembakau telah menunjukkan nisbah auksin kepada sitokin yang rendah dalam media akan menghasilkan pembentukan pucuk dan keadaan

sebaliknya menggalakkan pembentukan akar. Manakala kalus dibentuk sekiranya nisbah auksin dan sitokinin adalah sama.

Dalam kajian ini pembentukan akar boleh berlaku dalam kedua-dua keadaan samada nisbah auksin rendah dari sitokinin atau sebaliknya. Ini menunjukkan respons eksplan adalah berbeza mengikut genotip, spesies dan faktor fizikal. Perkembangan kalus boleh berlaku pada kesemua eksplan tetapi bergantung kepada media yang digunakan. Eksplan yang dikultur di atas media MS dengan 2,4-D ( 0.5-1.0 mg/l ) tanpa kombinasi atau dengan kombinasi BA membentuk kalus yang longgar, putih kekuningan dan tiada potensi untuk regenerasi ( Plat 8 ). Keputusan kajian ini selaras dengan pendapat Bajaj (1979) di mana beliau mendapati bahawa kalus dihasilkan apabila 2,4-D ditambah ke dalam kultur meristem pucuk tumbuhan *Arachis hypogea*. Hasil yang sama juga diperolehi dari eksplan kotiledon tumbuhan kekacang yang dikultur di atas media yang sama ( Gosal dan Bajaj, 1979 ). Kalus terbentuk hasil dari interaksi 2,4-D eksogenus dan rembesan cecair dari tisu-tisu tercedera ( Yeoman dan Aitchison, 1977 ). Menurut Kumar *et al.*, (1983) 2,4-D adalah hormon yang paling efektif untuk menginduksikan kalus berbanding dengan NAA dan IAA. Mereka telah menjalankan kajian ke atas tumbuhan *Cajanus cajan*. Basal dan Pandey (1993) juga mendapati kombinasi kepekatan 2,4-D yang tinggi ( 5.0-10.0 mg/l ) dengan kepekatan BA yang berbeza akan merencat semua jenis organogenesis dan hanya menginduksikan kalus dari eksplan daun *Sesbania aculeata*.



Plat 8 : Pembentukan kalus longgar, putih kekuningan dan tiada potensi untuk regenerasi dari eksplan daun *C. annum* yang dikultur di atas media MS yang dibekalkan dengan 0.5 mg/l 2,4-D selepas 3 minggu.

Perkembangan kalus juga boleh terbentuk dari bahagian pemotongan atau pun tempat luka pada peringkat permulaan kultur. Menurut Haberlandt (1902), kalus diinduksikan oleh interaksi di antara hormon yang dirembeskan oleh bahagian sel-sel yang luka disebabkan pemotongan dan hormon eksogenus yang diberi dari luar. Pemotongan menyebabkan kemusnahan pada sel dan seterusnya menyebabkan pembengkakan sel-sel di bawah lapisan sel yang musnah (Yeoman dan Aitchison, 1977). Sel-sel yang luka ini akan kehilangan isi kandungannya ke dalam media atau diserap oleh sel-sel sekitarnya. Ketidakseragaman ini menggalakkan pembahagian pada peringkat permulaan dan seterusnya menggalakkan pembahagian di sekeliling eksplan (Yeoman *et al.*, 1968). Pembebasan hasil autolitik ini bermula sebaik sahaja pemotongan dilakukan dan berterusan sehingga lapisan luar merosot.

Kalus berbeza antara satu sama lain dari segi morfologinya di mana setengah kalus adalah padat, agak keras dan ada yang bertekstur longgar. Regenerasi tumbuhan selalunya diperolehi dari tisu kalus longgar berwarna putih kekuningan. Apabila keratan melalui kalus dilakukan, terdapat bahagian meristematis yang padat di bahagian tengah kalus yang bertindak sebagai tapak atau tempat bermulanya pertumbuhan plantlet. Menurut Grant dan Fuller (1968), kalus-kalus bertekstur longgar mempunyai ciri-ciri meristematis atau nodul yang dipisahkan oleh sel yang tidak membeza. Bermula dari sel-sel meristematis, kalus membesar terutamanya dalam nodul dan membesar beransur-ansur menjadi plantlet. Kalus yang lebih padat kurang membeza dan mempunyai lebih banyak sel bervakuol. Selain daripada itu, kebanyakan dinding kalus yang padat ini terdiri dari polisakarida, peratus selulosa yang rendah jika dibandingkan dengan bahan

pektin dan hemiselulosa. Selulosa meningkatkan kesegahan atau ketegangan sel dan pertambahan bahan pektin membuatkan sel lebih kukuh seterusnya menghalang fragmentasi (Yeoman dan Aitchison, 1977). Oleh itu kalus yang padat sukar membeza untuk menghasilkan plantlet.

Daripada 20 kombinasi hormon-hormon NAA, BA, IAA dan 2,4-D yang telah digunakan dalam kajian ini, hanya 9 kombinasi sahaja yang boleh menghasilkan regenerasi. Jadual 6 menunjukkan media MS dengan IAA pada kepekatan rendah ( 0.1 mg/l ) hanya menginduksikan pembentukan kalus. Apabila kepekatan IAA ditambah ( dari 0.1 mg/l kepada 0.2 mg/l ) eksplan petiol dan pucuk menghasilkan plantlet lengkap secara langsung. Eksplan pucuk hanya membentuk kalus. Begitu juga sekiranya kepekatan IAA ini ditingkatkan menjadi 0.4 mg/l, kesemua eksplan dapat membentuk kalus. Apabila eksplan batang, daun, petiol dan akar dikultur di atas media MS dengan kombinasi hormon IAA dan BA pada kepekatan rendah ( 0.1 mg/l IAA dan 0.5 mg/l BA ) kalus terhasil. Semua eksplan yang digunakan telah menghasilkan akar di atas media MS yang ditambah dengan 0.1 mg/l IAA dan 1.0 mg/l BA.

Kalus dihasilkan dari semua eksplan yang dikultur di atas media MS yang dibekalkan dengan hormon NAA sahaja ( 0.2 mg/l ). Apabila 0.2 mg/l NAA dan 1.0 mg/l BA ditambah kepada media MS, kesemua eksplan batang, daun, petiol dan pucuk tidak menunjukkan sebarang respons dan akhirnya mati. Penambahan 2,4-D kepada media MS telah menginduksikan kalus dari semua eksplan. Media MS yang dibekalkan dengan 2,4-

D sahaja atau kombinasi BA juga menginduksikan kalus dari semua eksplan yang digunakan.

Regenerasi tumbuhan lengkap *C.annuum* var. MC 5 dihasilkan melalui 2 cara iaitu secara langsung dan tidak langsung. Regenerasi langsung ialah melalui pembentukan plantlet lengkap dari eksplan tanpa mengalami embriogenesis atau pembentukan kalus terlebih dahulu. Pembentukan plantlet lengkap mungkin disebabkan oleh nisbah sitokinin kepada auksin yang lebih tinggi. Hormon sitokinin ini mungkin merupakan sitokinin endogenus yang terdapat di dalam eksplan di mana fungsi sitokinin adalah untuk pembahagian sel, pembentukan tunas lateral dan tumbesaran daun. Dalam kajian ini plantlet dihasilkan dari eksplan pucuk, batang dan petiol yang dikultur di atas media MS yang dibekalkan dengan 0.2 mg/l IAA (Plat 2b, 2c dan 2d).

Regenerasi tidak langsung pula, terdapat pembentukan kalus terlebih dahulu pada eksplan dan seterusnya penghasilan pucuk berganda berlaku apabila eksplan batang dan daun dikultur di atas media MS yang ditambah dengan 0.5 mg/l IAA dan 5.0 mg/l BA serta kombinasi 1.5 mg/l IAA dan 6.0 mg/l BA. Apabila eksplan batang dan daun dikultur di atas media yang dibekalkan hormon eksogenus, pembahagian sel terus berlaku selepas luka ditutupi oleh sel-sel dan membentuk kalus. Kalus mula menunjukkan pertumbuhan yang agak berbeza dengan kemunculan bentuk-bentuk berbonjol di sekelilingnya berikutan dengan kemunculan kalus. Menurut Gautheret (1959), ini disebabkan oleh pembentukan nodul-nodul meristik daripada tisu-tisu yang terletak di bahagian dalam. Biasanya nodul-nodul ini akan menjadi pusat pertumbuhan yang tidak

membeza lagi dan mula menghasilkan sel-sel di bahagian pinggirnya. Sel-sel inilah yang memberi bentuk membonjol pada kalus tersebut. Kalus-kalus ini akan terus membahagi sehingga membentuk pucuk berganda dengan kehadiran sitokinin eksogenus dalam media atau sel-sel itu sendiri menghasilkan sitokinin. Sitokinin memainkan peranan penting dalam sistem kultur, di antaranya ialah mengaktifkan pembahagian sel, pembentukan pucuk berganda, pembentukan akar dan embriogenesis somatik. Manakala auksin pula berfungsi dalam pembentukan kalus, klorofil, morfogenesis dan embriogenesis somatik.

Dalam kajian ini, terdapat 5 media MS yang mengandungi kombinasi IAA dan BA yang menghasilkan regenerasi tumbuhan lengkap di mana 2 darinya menghasilkan regenerasi secara langsung ( media MS dan 0.2 mg/l IAA dan media MS dan 0.3 mg/l IAA ). Media MS dengan kombinasi 0.5 mg/l IAA dan 5.0 mg/l BA; 1.0 mg/l IAA dan 4.0 mg/l BA; 1.5 mg/l IAA dan 6.0 mg/l BA menginduksikan pucuk berganda dari eksplan batang dan daun ( Jadual 6, Plat 7 dan 3 ).

Respons eksplan yang berlainan terhadap media kultur menunjukkan kesan yang berbeza sepetimana yang telah dibuktikan oleh M'Ribu dan Veilleux (1990). Mereka telah menggunakan eksplan daun dan batang dalam kajian mereka terhadap *Solanum phureja*. Hasil yang didapati menunjukkan frekuensi regenerasi eksplan daun adalah lebih tinggi daripada eksplan batang. Keputusan yang hampir sama juga telah diperolehi dalam kajian ini. Jadual 6 menunjukkan eksplan daun yang dikultur di atas media MS

yang dibekalkan dengan 1.5 mg/l IAA dan 6.0 mg/l BA menghasilkan 40% regenerasi tetapi eksplan batang hanya menghasilkan 35% regenerasi di atas media yang sama.

Respons eksplan kepada nisbah dan kepekatan hormon yang digunakan tidak menunjukkan corak morfogenesis yang spesifik bagi *C. annuum*. Kadangkala respons eksplan ini menepati hipotesis Skoog dan Miller (1957) di mana mereka membuat kesimpulan bahawa nisbah auksin yang tinggi kepada sitokinin akan menginduksikan akar dalam tembakau. Sekiranya nisbah sitokinin yang tinggi kepada auksin akan menghasilkan pucuk dan jika nisbah auksin kepada sitokinin adalah sama akan menggalakkan pembentukan kalus. Manakala Flick *et al.*, (1983) pula berpendapat, nisbah auksin yang tinggi kepada sitokinin menghasilkan pembentukan kalus dan kandungan auksin yang lebih rendah menyebabkan pembentukan pucuk dalam spesies tembakau. Walaupun begitu, dalam kajian ini media MS dengan 2.0 mg/l IAA menghasilkan peratus pembentukan plantlet yang tinggi iaitu 80.0% dari eksplan batang dan pucuk *C. annuum* var. MC 4 dan MC 5. Media MS yang mengandungi 0.3 mg/l IAA juga boleh menginduksikan regenerasi tetapi lebih rendah (30.0%). Penghasilan regenerasi dari pucuk berganda diperolehi dari media MS yang dibekalkan dengan 0.5 mg/l IAA dan 5.0 mg/l BA (25 - 30%).

Regenerasi tumbuhan lengkap sebanyak 80% juga diperolehi dari eksplan daun yang dikultur di atas media MS yang dibekalkan dengan 1.0 mg/l IAA dengan 4.0 mg/l BA. Peningkatan kepekatan hormon IAA dari 0.9 mg/l kepada 1.5 mg/l dengan 6.0 mg/l

BA menginduksikan pembentukan pucuk berganda dari eksplan daun dan batang (35 - 40%).

Berdasarkan kepada keputusan-keputusan yang diperolehi, hormon IAA dan BA merupakan hormon yang sesuai untuk mendapatkan regenerasi *C. annuum* var. MC 5. Regenerasi tumbuhan lengkap yang berusia 3 minggu disubkultur ke dalam media yang mempunyai komposisi yang sama sebanyak 2 kali sebelum dipindahkan ke tanah yang telah diautoklaf. Selepas 6 minggu, anak pokok ini didedahkan kepada persekitaran biasa (suhu bilik) secara beransur-ansur untuk menyesuaikan plantlet dari keadaan *in vitro* kepada keadaan *in vivo*. Regenerasi tumbuhan *in vitro* yang telah dilengkapi dengan akar, dipindahkan ke atas tanah steril dan didedahkan kepada persekitaran biasa (suhu bilik) selama 10 minit pada hari pertama, 15 minit hari kedua dan 30 minit pada hari berikutnya selama seminggu. Anak pokok ini kemudiannya dipindahkan ke dalam pasu yang mengandungi tanah kebun selama 2 minggu dan diletakkan di bawah keadaan teduh pada suhu 30-35°C. Apabila regenerasi tumbuhan ini telah biasa dengan persekitaran *in vivo*, anak pokok ini dipindahkan ke kebun. Setelah 3 bulan dipindahkan, pokok cili ini telah mengeluarkan bunga dan seterusnya menghasilkan buah (Plat 4, 5 dan 6).

Penentuan aktiviti sel dari sel-sel akar yang ditanam secara *in vitro* meliputi penentuan nilai indeks mitosis (MI), bilangan kromosom, tahap ploidi, purata luas sel dan nukleus serta masa penggandaan sel (Cdt). Pada umumnya dalam kajian ini didapati nilai MI bagi *C. annuum* dalam keadaan *in vitro* adalah lebih tinggi dari keadaan *in vivo* (Jadual 2), tetapi nilai ini berkang jika terlalu lama di dalam kultur ( selepas 6 bulan).

Ini berkemungkinan di sebabkan perbezaan persekitaran tisu dan pemotongan eksplan pada peringkat permulaan kultur di mana proses pembahagian sel pada meristem akar telah terganggu. Pemotongan eksplan menyebabkan kemusnahan sel-sel di sepanjang permukaan keratan. Semasa pemotongan eksplan, semua sel parenkima adalah dalam keadaan  $2C$  dalam spesies *Helianthus tuberosus* ( Mitchell, 1967 ). Tisu-tisu ini berhenti membahagi untuk seketika dan keadaan ini berlaku semasa fasa rehat.

Sebaik sahaja selepas pemotongan, proses pengaktifan bermula. Kecederaan sel menyebabkan nutrien dan bahan metabolit sel dirembeskan ke persekitaran dan seterusnya menyebabkan autolisis dan pembebasan enzim hidrolitik. Keadaan ini ditunjukkan oleh tisu dorman pada tuber *Solanum tuberosum* ( Kahl, 1973 ) di mana proses pemotongan penting untuk mengubah aktiviti sel dan bahan metabolit yang mempengaruhi mitosis. Hasil autolisis dibebaskan ke dalam media atau diserap oleh sel-sel dipersekitarannya (Yeoman *et al.*, 1968). Pengaktifan yang pesat menyebabkan sel-sel G1 beransur-ansur memulakan fasa S dan seterusnya memasuki mitosis. Bagi var. MC 4, selepas seminggu di dalam kultur, nilai MI adalah rendah ( $21.63 \pm 1.10\%$ ) tetapi bagi var. MC 5 nilai MInya lebih tinggi sedikit iaitu  $37.37 \pm 5.84\%$  dan berbeza dengan bererti ( $P < 0.005$ , Jadual 2). Selepas seminggu nilai MI bagi akar yang ditanam secara *in vitro*, bagi kedua-dua varieti ini adalah lebih tinggi daripada nilai MI sel-sel akar dari sistem *in vivo*. Apabila segmen akar kedua-dua varieti dikultur di atas media MS yang mengandungi hormon eksogenus ( 0.2 mg/l IAA ), sel-sel meristem akar giat membahagi. Menurut Mahmood *et al.*, (1995), media MS yang dibekalkan dengan IAA akan

menggalakkan pembentukan akar berdasarkan kajian mereka terhadap beberapa kultivar cili termasuklah var. MC 4.

Pada minggu berikutnya iaitu minggu kedua di dalam kultur, nilai indeks mitosis (MI) var. MC 4 terus meningkat menjadi  $39.50 \pm 1.02\%$  tetapi bagi var. MC 5 nilai indeks mitosis (MI) adalah lebih rendah ( $31.10 \pm 3.0\%$ ) daripada nilai pada minggu pertama. Pada minggu ketiga pula, nilai indeks mitosis (MI) yang tertinggi direkodkan bagi kedua-dua varieti iaitu  $65.25 \pm 2.50\%$  bagi var. MC 4 dan  $74.90 \pm 3.33\%$  adalah nilai indeks mitosis (MI) tertinggi bagi var. MC 5. Peningkatan nilai indeks mitosis (MI) ini menunjukkan lebih banyak sel membahagi untuk membentuk akar. Ini adalah kerana eksplan akar dikultur di atas media MS yang dibekalkan dengan  $0.2 \text{ mg/l IAA}$  iaitu media yang boleh menginduksikan akar dengan banyak ( $85.0\%$ ) bagi kedua-dua varieti cili tempatan ini.

Auksin telah dikenalpasti untuk membantu pemanjangan dan pembahagian sel yang seterusnya menyebabkan pemanjangan akar. Nilai indeks mitosis (MI) menurun pada minggu keempat ( $45.65 \pm 0.92\%$ ), minggu kelima ( $43.25 \pm 0.82\%$ ) sehingga  $30.02 \pm 0.97\%$  (var. MC 4) dan  $15.29 \pm 1.23\%$  (var. MC 5) pada minggu ketujuh. Ini menunjukkan kekurangan bilangan sel-sel yang aktif membahagi pada tempoh ini samada disebabkan oleh kekurangan sel yang memasuki fasa mitosis atau fasa intermitosis menjadi perlahan (Evans *et al.*, 1957). Nilai indeks mitosis (MI) bagi sel-sel meristem akar yang berusia 6 bulan di dalam keadaan *in vitro* bagi var. MC 4 ialah  $12.16 \pm 0.43\%$  iaitu nilai indeks mitosis (MI) yang terendah. Nilai ini adalah lebih rendah jika

dibandingkan dengan nilai indeks mitosis (MI) bagi akar tumbuhan 'intact' iaitu  $20.56 \pm 1.95\%$ . Walaupun begitu, nilai indeks mitosis (MI) bagi sel-sel akar var. MC 5 yang berumur 6 bulan di dalam kultur adalah sama dengan nilai indeks mitosis (MI) sel akar yang berumur 7 minggu ( $15.29 \pm 1.23\%$ ). Penurunan semula nilai indeks mitosis (MI) setelah dibiarkan lama (6 bulan) di dalam keadaan *in vitro* dan menghampiri nilai indeks mitosis (MI) *in vivo*, menunjukkan se-sel cuba menyesuaikan diri untuk menjadi stabil seperti dalam persekitaran *in vivo*.

Bilangan kromosom dalam keadaan diploid *C. annuum* var. MC 4 dan var. MC 5 ialah  $2n = 24$  (Khan, 1976). Berdasarkan kepada kajian yang telah dijalankan, didapati bilangan kromosom bagi sel-sel akar yang ditanam secara *in vivo* bagi spesies ini ialah 24, begitu juga dengan bilangan kromosom dalam sistem *in vitro*. Berdasarkan kepada pemerhatian bilangan kromosom pada setiap minggu iaitu bermula dengan minggu pertama di dalam kultur sehingga minggu ketujuh, tiada perubahan yang diperhatikan. Bilangan kromosom spesies *C. annuum* var. MC 4 dan var. MC 5 masih juga 24 walaupun setelah 6 bulan di dalam keadaan *in vitro*. Ini menunjukkan *C. annuum* varieti tempatan ini adalah spesies yang stabil dari segi bilangan kromosomnya di mana selalunya spesies yang mempunyai bilangan kromosom stabil mempunyai keupayaan yang tinggi untuk menghasilkan regenerasi. Oleh itu tumbuhan yang ditanam secara *in vivo* dan tumbuhan dari sistem *in vitro* *C. annuum* var. MC 4 dan MC 5 tidak menunjukkan sebarang perbezaan dari segi morfologinya.

Dalam kajian ini kultur sel akar hanya menginduksikan akar sahaja dan tiada regenerasi plantlet yang diperolehi. Kehilangan kapasiti untuk membentuk pucuk dikaitkan dengan perkembangan paras ploidi di dalam tisu atau dengan penambahan darjah aneuploidi (Torrey, 1967). Jika bilangan kromosom diambil kira, bilangan kromosom sel-sel akar yang dikultur adalah diploid. Oleh itu, sel-sel di dalam kultur dijangka boleh menghasilkan regenerasi akar dan keputusan yang sama telah diperolehi dalam kajian ini. Walau bagaimanapun apabila kandungan DNA nukleus sel-sel akar ditentukan, telah didapati bahawa tahap ploidi yang tinggi wujud pada sel-sel interfasa iaitu  $14C$  kandungan DNAnya. Menurut Torrey (1967), kultur sel tumbuhan dalam keadaan *in vitro* masih berkeupayaan untuk menghasilkan akar sekiranya tahap ploidi adalah tinggi. Dalam kajian ini rizogenesis berlaku pada kultur akar tetapi tiada regenerasi lengkap tumbuhan diperolehi. Tahap ploidi yang terlalu tinggi akan menyebabkan pembahagian normal sel terganggu dan pembentukan struktur terorganisasi tidak lengkap dan seterusnya regenerasi tumbuhan tidak diperolehi.

Kehadiran nukleus poliploid di dalam kultur tisu mungkin bergantung kepada keadaan persekitaran sistem *in vitro* yang merangsang proses endoreduplikasi pada populasi sel. Menurut D'Amato (1977), apabila sel tidak mengalami endoreduplikasi DNA dalam keadaan *in vivo*, maka poliploidi yang terjadi dalam sistem *in vitro* mungkin berpunca dari mekanisme pembentukan nukleus restitusi atau percantuman gelendum dalam sel binukleate atau multinukleate. Oleh kerana tiada pembentukan sel binukleate atau multinukleate yang diperhatikan dalam kajian ini, maka kehadiran nukleus poliploidi

berkemungkinan besar adalah hasil dari restitusi nukleus akibat daripada kegagalan pembentukan gelendung dan kromosom 'lagging' pada anafasa ( Bayliss, 1973 ).

Keadaan persekitaran *in vitro* juga mempengaruhi poliploidisasi terutamanya hormon eksogenus seperti auksin dan juga suhu ( Binns dan Meins, 1980 ). Dalam kajian ini auksin eksogenus (0.2 mg/l IAA) yang dibekalkan kepada media MS mungkin menyebabkan poliploidisasi populasi sel di dalam kultur. Matthysse dan Torrey (1967) telah mendapati, penambahan auksin dalam media kultur pada 24 jam pertama dan diikuti dengan penambahan kinetin selepas 24 jam menunjukkan frekuensi normal pembahagian sel pada tumbuhan kecacang. Suhu juga merupakan faktor yang mempengaruhi poliploidisasi. Ini dibuktikan oleh Binns dan Meins (1980) yang mendapati sel yang diasingkan dari tisu yang telah diinkubasi selama 21 hari pada suhu 35°C di atas media tanpa hormon adalah diploid. Manakala sel yang diasingkan dari suhu 25°C mempunyai bilangan kromosom yang lebih tinggi dari sel tetraploid.

Kandungan DNA nukleus mungkin berkaitan dengan volum nukleus di mana saiz nukleus dijangka akan mengganda pada setiap kali penggandaan kandungan DNA. Selepas pembahagian sel iaitu fasa G1, saiz nukleus adalah kecil. Semasa fasa ini (G1) kandungan DNA sel adalah 2C. Seterusnya nukleus mengalami replikasi menjadikan jumlah DNA adalah 4C dan menggandakan saiz sebelum memulakan pembahagian sekali lagi. Dalam kajian ini luas sel dan nukleus *C.annuum* adalah lebih rendah dalam keadaan *in vitro* untuk tempoh yang singkat ( 1, 2 dan 3 minggu ). Walaupun begitu, saiz sel dan nukleus bertambah jika dibiarkan lama di dalam kultur ( 4, 5, 7 minggu dan 6 bulan ).

Purata luas sel akar var. MC 4 *in vivo* ialah  $261.43 \pm 6.56 \mu\text{m}^2$  dan tidak berubah setelah seminggu di dalam kultur iaitu  $260.95 \pm 6.19 \mu\text{m}^2$ . Bagi var. MC 5 pula purata luas sel meristem akar adalah berkurang setelah seminggu, 2 minggu dan 3 minggu di dalam kultur. Didapati bahawa perubahan saiz sel adalah tidak bersandar kepada perubahan saiz nukleus. Perubahan saiz nukleus *in vitro* ( $77.23 \pm 1.76 \mu\text{m}^2$ ) spesies ini adalah signifikan ( $p < 0.05$ ) dengan saiz nukleus *in vivo* ( $67.05 \pm 1.77 \mu\text{m}^2$ ). Selepas 6 bulan di dalam kultur, saiz sel menjadi  $198.12 \pm 4.10 \mu\text{m}^2$  sementara saiz nukleus menjadi  $72.32 \pm 1.96 \mu\text{m}^2$ . Pertambahan saiz sel dan nukleus ini adalah berbeza dengan bererti ( $p < 0.05$ ) apabila dibandingkan dengan saiz sel 'intact' (*in vivo*).

Pada peringkat permulaan pemindahan sel-sel meristem akar kepada keadaan *in vitro*, tiada penambahan purata luas sel untuk minggu 1, 2, dan 3 di dalam kultur. Ini adalah kerana kebanyakan daripada sel melakukan pembahagian untuk pembentukan akar di mana selalunya se-sel yang sedang membahagi bersaiz kecil. Keadaan ini berbeza dengan pendapat Thomas dan Davidson (1983) mengenai percambahan *Vicia faba*. Mereka mencadangkan bahawa perhubungan di antara saiz nukleus dan sel boleh berubah tanpa mempengaruhi aktiviti mitosis dan nukleus masih mengekalkan saiznya walaupun berlaku perubahan saiz sel. Pendapat ini berbeza dengan keputusan kajian yang diperolehi oleh Abu Shah dan Taha (1994) ke atas sel akar *Psophocarpus tetragonolobus* di mana nilai MI, purata luas sel dan nukleus adalah berkurang apabila tisu-tisu morfogenetik dan bukan morfogenetik diletakkan dalam keadaan *in vitro*.

Daripada keputusan kajian, didapati purata luas nukleus bagi *C. annum* tidak bergantung kepada luas sel dalam keadaan *in vitro*. Pertambahan atau pengurangan luas sel tidak mempengaruhi saiz nukleus. Keputusan ini bercanggah dengan pendapat Cavalier-Smith (1982) yang menyatakan saiz sel dan nukleus adalah saling berkaitan dan saling bergantung antara satu sama lain. Mereka juga berpendapat; kedua-dua parameter tersebut dikawal oleh kuantiti DNA sel iaitu bersamaan dengan pendapat Jordan *et al.*, (1987). Walau bagaimanapun dalam kajian ini luas sel dan nukleus tidak menunjukkan sebarang korelasi dengan kandungan DNA. Walaupun kandungan DNA bertambah dari  $5\text{C}$  (*in vivo*) kepada  $6\text{C}$  pada minggu pertama di dalam keadaan *in vitro* tetapi saiz sel adalah berkurang ( $176.86 \pm 4.23 \mu\text{m}^2$ ) berbanding dengan saiz sel *in vivo* ( $265.82 \pm 8.2 \mu\text{m}^2$ ). Saiz nukleus pula bertambah menjadi  $77.23 \pm 1.76 \mu\text{m}^2$  (*in vitro*) dari  $69.82 \pm 1.77 \mu\text{m}^2$  (*in vivo*). Kandungan DNA nukleus sel-sel akar *in vitro* yang berumur 3 minggu adalah berkurang ( $4.3\text{C}$ ) daripada sebelumnya iaitu  $6.0\text{C}$ . Apabila kandungan DNA nukleus berkurang menjadi  $4.5\text{C}$  pada minggu keempat di dalam kultur, purata saiz sel dan nukleus meningkat kepada  $192.83 \pm 4.84 \mu\text{m}^2$  dan  $72.25 \pm 1.73 \mu\text{m}^2$ .

Menurut Van't Hof (1965) terdapat perkaitan di antara kandungan DNA sel, volum nukleus dan jangkamasa kitaran mitosis. Tempoh kitaran mitosis akan meningkat dengan pertambahan kandungan DNA sel terutamanya dalam fasa S kitaran sel. Lebih banyak DNA yang perlu direplikasi, maka tempoh kitaran menjadi lebih panjang dan pertambahan tempoh ini mempengaruhi jangkamasa fasa S. Dalam kajian ini, masa penggandaan sel (Cdt) dikira dari kultur yang berusia 3 minggu. Sel-sel akar yang berumur 21 hari ini dipilih kerana sel-sel ini mempunyai nilai indeks mitosis (MI) yang

tertinggi ( $74.90 \pm 3.33\%$ ) dan mempunyai peratus sel tertinggi dalam fasa S ( $34.2\%$ ) berbanding dengan sel-sel akar pada tempoh kultur yang lain. Tempoh yang diambil oleh sel-sel akar *in vitro* untuk menggandakan populasinya ialah 9.07 jam sahaja berbanding dengan 15.07 jam bagi sel-sel akar *in vivo*.

Masa penggandaan sel (Cdt) merupakan petunjuk penting bagi purata tempoh kitaran sel dan telah dibuktikan dalam beberapa spesies terpilih. Sebagai contoh, Bayliss (1975a) telah mendapati kitaran sel bagi kultur diploid *Daucus carota* ialah 51.2 jam di mana purata masa penggandaan selnya adalah 50.9 jam. Pada umumnya, nilai masa penggandaan sel (Cdt) *in vitro* adalah lebih lama berbanding dengan *in vivo*. Kenyataan ini adalah selaras dengan keputusan kajian yang telah dilakukan oleh beberapa orang saintis, contohnya Bayliss (1975a) telah mendapati tempoh kitaran sel kultur *Daucus* ialah 51.2 jam sedangkan tempoh kitaran sel dalam sel tumbuhan 'intact' hanya 7.5 jam. Tempoh kitaran sel *Vicia faba* *in vitro* adalah 138.6 jam tetapi hanya 12 - 24 jam sahaja bagi sel *in vivo*. Kajian ini telah dilakukan oleh Taha dan Francis (1993). Walaupun begitu, keputusan sebaliknya diperolehi dalam kajian terhadap *C. annuum* ini iaitu masa penggandaan sel bagi sel akar *in vivo* ialah 15.07 jam bagi var. MC 5 dan 24.83 jam bagi var. MC 4. Selepas 3 minggu di dalam kultur, masa yang diambil oleh sel untuk menggandakan bilangannya adalah lebih singkat iaitu 9.07 jam (var. MC 5) dan 8.14 jam var. MC 4. Keputusan ini berlawanan dengan pemerhatian yang dilakukan oleh Bayliss (1975a) yang menyatakan masa penggandaan sel (Cdt) bagi kultur sel *in vitro* adalah lebih lama berbanding dengan sel-sel *in vivo*. Begitu juga dengan kajian Taha *et al.*, (1990) terhadap *H. sabdariffa* yang mendapati nilai masa penggandaan sel (Cdt) bagi *in*

*vivo* ialah 164.25 jam dan menjadi lebih lama selepas 14 hari di dalam kultur iaitu 196.36 jam. Dalam kajian ini, didapati nilai Cdt *in vitro* lebih singkat diperolehi berbanding dengan nilai masa penggandaan sel (Cdt) *in vivo* seterusnya menunjukkan *C. annuum* varieti tempatan ini mempunyai keupayaan regenerasi yang tinggi apabila sel-selnya diletakkan di bawah keadaan *in vitro*.

Masa penggandaan sel (Cdt) bagi akar 'intact' ialah 15.07 jam tetapi dalam keadaan *in vitro* tempoh ini disingkatkan hampir separuh (9.07 jam). Keadaan ini berlaku mungkin disebabkan kehadiran hormon eksogenus di dalam media kultur seperti IAA iaitu auksin yang menggalakkan pembahagian sel. Oleh yang demikian nilai indeks mitosis (MI) menjadi lebih tinggi iaitu peratus sel yang membahagi adalah lebih tinggi dan kadar tumbesaran meningkat. Keputusan ini adalah sama seperti keputusan penentuan masa penggandaan sel bagi *Daucus* yang menunjukkan nilai masa penggandaan sel (Cdt) sel-sel *in vitro* adalah 6 jam berbanding dengan 14 jam dalam keadaan *in vivo* ( Fujimura dan Komamine, 1982).

Parameter aktiviti sel seperti bilangan kromosom, purata luas sel dan nukleus, kandungan DNA dan nilai indeks mitosis diambil dari kultur akar iaitu dari tisu bukan regeneratif. Oleh kerana tiada regenerasi dari kultur akar, maka eksplan lain iaitu batang, daun, petiol dan pucuk digunakan untuk mendapatkan regenerasi. Respons eksplan-eksplan ini untuk menghasilkan regenerasi adalah berbeza mengikut media dan kombinasi hormon yang digunakan. Apabila eksplan batang, petiol dan pucuk dikultur di atas media MS yang dibekalkan dengan 0.2 mg/l IAA, kesemuanya boleh meregenerasi

tumbuhan lengkap. Oleh itu eksplan-eksplan ini dianggap sebagai tisu regeneratif di atas media tersebut tetapi eksplan daun adalah tisu bukan regeneratif kerana ia hanya menginduksikan kalus sahaja.

Perbandingan aktiviti-aktiviti sel telah dikaji di antara 2 jenis tisu ini iaitu tisu regeneratif dan tisu bukan regeneratif. Sel-sel dari tisu tidak regeneratif ( eksplan daun ) di atas media MS yang ditambah dengan 0.2 mg/l IAA selepas 3 minggu di dalam kultur mempunyai bilangan kromosom yang sama dengan tumbuhan 'intact' iaitu 24 pada julat 20 - 24 di mana masih berada dalam julat kromosom diploid. Berdasarkan kepada keputusan kajian bilangan kromosom *in vivo* dan *in vitro* bagi *C. annuum* dalam kajian ini, telah didapati *C. annuum* var. MC 4 dan var. MC 5 mempunyai bilangan kromosom yang stabil iaitu 24 samada dalam keadaan *in vivo* atau *in vitro* ( Plat 1).

Pada umumnya, segmen dari tisu akar tumbuhan 'intact' adalah terdiri daripada sel-sel diploid ( $2n = 24$ ). Komposisi nukleus selalunya adalah seragam samada dari tisu yang diasingkan dari akar atau daun yang berasal dari pokok yang sama. Walau bagaimanapun apabila tisu diletakkan di dalam kultur, berlaku beberapa perubahan terhadap konstitusi nukleus, kehadiran hormon eksogenus seperti IAA menggalakkan pembahagian sel secara giat dan menghasilkan kalus. Sel kultur terutamanya dari kalus mempunyai ketakstabilan genetik pada beberapa spesies (Karp *et al.*, 1982; D'Amato, 1985, 1990). Contohnya tumbuhan *Prunus amygdalus* yang mempunyai bilangan kromosom 16, menunjukkan bilangan kromosom yang berubah-ubah apabila berada di dalam keadaan *in vitro* iaitu 9, 15, 16, 24, 28 dan 32. Perubahan struktur kromosom

samada dari segi translokasi, pembentukan kromosom disentrik dan isokromosom mudah berlaku dalam kultur tisu contohnya dalam spesies *Lolium longiflorum* (Sheridan, 1974); *Crepis capillaris* (Sacristan, 1971) dan *Triticum aestivum* (Kao *et al.*, 1970).

Segmen akar dari plantlet tumbuhan yang diinduksikan dari eksplan batang diawetkan dan bilangan kromosom ditentukan selepas 3 bulan di dalam kultur. Keputusan yang didapati ialah bilangan kromosom pada sel akar tisu regeneratif juga menunjukkan kestabilannya iaitu masih tetap 24 dan berjulat 20 - 24. Data ini menunjukkan bilangan kromosom bagi tisu regeneratif adalah sama dengan bilangan kromosom tumbuhan 'intact' dan juga tisu bukan regeneratif, seterusnya menggambarkan *C. annuum* var. MC 5 adalah spesies yang stabil dari segi bilangan kromosomnya. Keputusan yang sama diperolehi oleh Ezura *et al.*, (1993) yang mengkaji variasi bilangan kromosom ke atas regenerasi 14 kultivar *C. annuum* yang diinduksikan dari eksplan hipokotil dan radikel. Kesemua plantlet yang diregenerasikan menunjukkan bilangan kromosom yang sama dengan tumbuhan 'intact' iaitu 24. Begitu juga dengan kajian Harini dan Sita (1993) terhadap regenerasi tumbuhan *Capsicum* var. California wonder. Mereka telah melakukan kajian sitologi ke atas hujung akar regenerasi tumbuhan cili dan mendapat bilangan kromosomnya tetap normal ( 24 ).

Selain daripada *Capsicum*, ada juga tumbuhan lain yang tidak menunjukkan sebarang ketidakstabilan di dalam keadaan *in vitro* seperti *Lilium longiflorum* ( Sheridan, 1974, 1975 ), *Zea mays* ( Mc Coy dan Philips, 1982 ) dan *Apium graveolens* ( Orton, 1985 ). Walaupun begitu, Murashige dan Skoog (1962) telah mencadangkan kecacatan

pada kromosom seperti 'lagging' merupakan salah satu faktor yang mengurangkan keupayaan morfogenetik dalam kultur sel. Kenyataan ini disokong oleh Gould (1979) dalam spesies diploid *Brachycome dichromosomatica* dan Karp *et al.*, (1987) dalam *Hordeum vulgare*. Kajian ke atas kultur sel spesies *Brachycome dichromosomatica* menunjukkan kecacatan pada kromosom boleh mengganggu fasa edaran sel terutamanya fasa G1. Ini akan menyebabkan sel-sel yang memasuki fasa pembahagian (mitosis) akan berkurangan dan seterusnya pembahagian nukleus akan terganggu. Apabila keadaan ini berlaku maka keupayaan morfogenetik sel juga akan berkurangan.

Taburan kandungan DNA *in vivo* *C. annuum* menunjukkan taburan normal. Dalam sel akar tisu bukan regeneratif dari sistem *in vitro* menunjukkan kandungan DNA bertambah ( $12.5C$ ) berbanding dengan kandungan DNA bagi sel *in vivo* ( $5.7C$ ). Taburan kandungan DNA dari eksplan daun yang tidak regeneratif apabila dikultur di atas media MS yang ditambah dengan 0.2 mg/l IAA menunjukkan tiada sel pada fasa G1 tetapi terdapat 32.0% sel pada fasa S dan 34.7% sel dalam fasa G2. Tisu tidak regeneratif (eksplan daun) di atas media MS yang ditambah dengan 0.3 mg/l IAA juga menunjukkan taburan DNA yang hampir sama iaitu 32.0% sel pada fasa S, 34.0% sel dalam fasa G2. Peratus sel poliploid bagi tisu regeneratif dalam kedua-dua media menunjukkan peratus yang rendah iaitu 33.3% (dalam media MS + 0.3 mg/l IAA) dan 34.0% (dalam media MS + 0.3 mg/l IAA). Apabila nilai MI bagi tisu bukan regeneratif (eksplan daun) dalam kedua-dua media ini ditentukan, nilai yang rendah diperolehi iaitu 18.14% dan 30.3%.

Tisu-tisu yang mempunyai peratus sel poliploidi rendah akan mempunyai lebih potensi untuk membahagi dan meningkatkan bilangan sel seterusnya menghasilkan organogenesis (Evans dan Van't Hof, 1975). Sel akar dari tumbuhan hasil regenerasi mempunyai peratus nukleus poliploid yang tinggi ( 70.7% bagi eksplan batang ) dan nilai kandungan DNA sehingga  $12.2C$ . Ini membuktikan, sekiranya poliploidisasi tinggi dalam tisu, ia masih berpotensi untuk menghasilkan regenerasi disebabkan tahap toleransi yang tinggi. Keadaan yang sama diperhatikan dalam *Vicia faba* di mana walaupun terdapat poliploidi dan aneuploidi, regenerasi masih diperolehi ( Taha dan Francis, 1990 ).

Hasil dari pengiraan bilangan kromosom dalam sel akar tisu regeneratif didapati plantlet hasil regenerasi *C. annuum* adalah diploid (  $2n = 24$  ). Kandungan DNA bagi tisu regeneratif adalah di antara  $6.8C$  hingga  $12.6C$ . Walaupun terdapat sel-sel poliploidi, tisu-tisu dari eksplan batang, daun, petiol dan pucuk masih boleh menghasilkan regenerasi di atas media MS dengan kombinasi hormon tertentu. Spesies-spesies lain seperti *Brassica oleraceae* (Murashige dan Nakano, 1967), *Pisum sativum* ( Evans dan Van't Hof, 1975 ), *S. tuberosum* (Ramulu dan Dijkhuis, 1985) dan *Arabidopsis thaliana* (Galbraith *et al.*, 1991) juga boleh menghasilkan regenerasi walaupun kebanyakan daripada selnya menjadi poliploidi.

Apabila eksplan dikultur dalam keadaan *in vitro*, persekitaran sel ( *in vitro* ) akan mempengaruhi keadaan nukleus yang pada asalnya berada dalam keadaan *in vivo*. Dalam kajian ini, eksplan batang, daun, petiol dan pucuk merupakan tisu yang telah membeza. berbanding dengan eksplan akar, kebanyakan sel adalah meristik dan sebahagian

kecil saja mengandungi sel yang telah membeza. Tisu yang telah terbeza selalunya mengandungi campuran sel di antara sel yang mempunyai tahap DNA normal dan sel dengan nukleus endoreduplikasi iaitu polisomati (D'Amato, 1952). Menurut Singh dan Harvey (1975), kromosom 'lagging' boleh menghasilkan sel aneuploidi dan apabila eksplan dikultur lebih banyak nukleus poliploid diperhatikan. Kenyataan ini selaras dengan keputusan yang diperolehi dalam kajian ini, di mana peratus sel poliploidi dari kultur eksplan batang, daun, petiol dan pucuk regeneratif adalah lebih tinggi dari kultur akar (tisu bukan regeneratif).

Perubahan nukleus yang terjadi dalam keadaan *in vitro* mungkin juga disebabkan persekitaran *in vitro* tersebut. Dalam sistem kultur tisu, faktor hormon seperti auksin dan sitokinin samada eksogenus atau endogenus amat mempengaruhi tahap ploidi (Liscum dan Hangarter, 1991). Auksin telah diketahui berfungsi untuk merangsang sintesis DNA dan sitokinin pula diperlukan untuk melengkapkan mitosis serta sitokinesis (Das *et al.*, 1956; Patau *et al.*, 1957; Skoog dan Miller, 1957; Patau dan Das, 1961; Bergounoux *et al.*, 1988). Nisbah auksin : sitokinin berubah ketika dalam kultur disebabkan oleh metabolisme sel dan komposisi kimia media (Stasinopoulos dan Hangarter, 1991). Ini akan mengganggu proses-proses tertentu seperti replikasi DNA dan sitokinesis yang terjadi di luar fasa. Contohnya kepekatan auksin yang tinggi berbanding dengan sitokinin akan menyebabkan sintesis DNA berlaku dengan lebih cepat dan menjadi poliploidi. Manakala kepekatan sitokinin yang tinggi menyebabkan sel membahagi lebih awal dan kromosom menjadi fragmen atau menghilang semasa mitosis (Liscum dan Hangarter, 1991). Nisbah auksin kepada sitokinin yang tidak seimbang menggalakkan pembentukan

populasi sel heterogenus dan kultur menjadi berbeza dari eksplan primer serta menunjukkan asas-asas variasi somaklon.

Purata luas sel dan nukleus pada akar tisu bukan regeneratif (eksplan daun) menunjukkan saiz yang lebih kecil dari saiz sel *in vivo*. Purata luas sel tisu bukan regeneratif ialah  $232.37 \pm 6.89 \mu\text{m}^2$ , lebih kecil dari saiz sel *in vivo* iaitu  $265.82 \pm 3.42 \mu\text{m}^2$ . Manakala luas nukleus pula tidak berubah dan hampir sama ( $67.05 \pm 2.29 \mu\text{m}^2$  bagi tisu tidak regeneratif dan  $67.05 \pm 1.77 \mu\text{m}^2$  bagi sel *in vivo*). Kultur sel akar yang berumur 7, 14 dan 21 hari menunjukkan luas sel adalah lebih kecil dari luas sel *in vivo* tetapi saiz nukleus tidak menunjukkan perubahan yang bersandar dengan perubahan saiz sel. Nisbah luas nukleus kepada sel menunjukkan nilai konstan dalam semua kultur sel akar. Nisbah luas nukleus kepada sel bagi akar *in vivo* ialah 0.37; selepas seminggu di dalam kultur nisbahnya menjadi 0.41 dan berbalik kepada 0.37 pada 6 bulan kultur. Nisbah luas nukleus kepada sel bagi plantlet hasil dari eksplan petiol adalah 0.31 iaitu sama seperti nisbah pada plantlet-plantlet regenerasi dari eksplan batang. Ini menunjukkan tidak terdapat perhubungan di antara saiz sel dan nukleus pada tisu-tisu regeneratif.

Purata luas sel menjadi rendah di dalam keadaan *in vitro* pada jangkamasa 1, 2 dan 3 minggu. Pemerhatian ini adalah sama seperti pemerhatian oleh Taha dan Francis (1991) terhadap *Vicia faba*. Pengurangan saiz sel ini berhubung rapat dengan proses organogenesis di mana berkaitan dengan pembentukan pucuk dan akar. Dalam kajian ini, kultur sel akar yang berumur 28, 35, 56 hari dan 6 bulan menunjukkan pertambahan saiz

sel. Peningkatan saiz sel ini disebabkan oleh persekitaran kultur di mana adanya hormon eksogenus dalam media serta suhu dan pH media. Thomas dan Davidson (1983) telah merumuskan bahawa perubahan pada saiz sel dan nukleus adalah tidak mempengaruhi aktiviti mitosis sel. Perubahan saiz sel dan nukleus ini adalah disebabkan ketidakstabilan sel di dalam kultur selepas pemindahan sel dari satu keadaan ke suatu keadaan lain (dari keadaan *in vivo* ke keadaan *in vitro*).

Kajian sitologi dilakukan untuk melihat samada ada perkaitan antara aktiviti sel-sel dengan keupayaan regeneratif pada tisu atau sel sesuatu spesies tumbuhan. Parameter seperti masa penggandaan sel (Cdt), bilangan kromosom dan julat kromosom digunakan untuk melihat perubahan pada sel-sel yang ditanam pada keadaan *in vivo* dan juga *in vitro* dan seterusnya untuk mengaitkan dengan keupayaan regeneratif. Dalam kajian ini, walaupun peratus nukleus poliploid *C.annuum* adalah tinggi tetapi masih boleh menghasilkan regenerasi. Keadaan ini bertentangan dengan lapuran yang dihasilkan oleh Evans dan Van't Hof (1975) yang menyatakan regenerasi hanya boleh didapati dari peringkat diploid sahaja. Plantlet lengkap yang diperolehi telah berjaya dipindahkan ke tanah dan menghasilkan buah selepas 6 bulan ( Plat 5 dan 6).

Kajian yang lebih mendalam dan terperinci mengenai aktiviti selular *in vitro* dan perhubungan di antara morfogenesis tumbuhan dan keupayaan regenerasi pada *C. annuum* perlu dilakukan untuk meningkatkan mutu tanaman dan pengetahuan mengenainya. Kajian sitologi untuk jangkawaktu kultur yang lebih lama ( 1-2 tahun )

perlu dilakukan untuk menentukan samada terdapat variasi somaklonal dalam regenerasi *C. annuum*.