

BAB 4

***KAJIAN SITOLOGI AKAR
PRIMER C. annum var. MC 4
DAN MC 5 YANG DITANAM
SECARA IN VITRO***

BAB 4

KAJIAN SITOLOGI AKAR *C. annuum* var. MC 4 DAN MC 5 YANG DITANAM SECARA *IN VITRO*

4.1 TUJUAN EKSPERIMEN

Pembentukan tisu dan organ tumbuhan *in vitro* adalah melalui morfogenesis, di mana pada mulanya sel atau tisu tumbuhan yang dikultur akan membahagi melalui mitosis, kemudian pembezaan dan regenerasi tumbuhan lengkap berlaku dari kultur sel tersebut. Prinsip-prinsip dalam kultur sel adalah berdasarkan kepada 'Teori Sel' yang dikemukakan oleh Schleiden dan Schwann (1838), iaitu satu sel berkebolehan untuk menjadi tumbuhan lengkap. Tumbuhan lengkap akan terbentuk melalui proses-proses organogenesis atau embriogenesis (Horn dan Jensen 1987). Pertumbuhan sel-sel tumbuhan dalam kultur dipengaruhi oleh faktor-faktor seperti jenis dan komposisi nutrien, pH media, keamatian cahaya, suhu dan sumber eksplan. Komposisi nutrien yang dibekalkan kepada tumbuhan memainkan peranan penting kerana tumbesaran dan morfogenesis *in vitro* adalah dipengaruhi oleh interaksi danimbangan nutrien dan hormon dalam media dan hormon yang sedia ada dalam tisu eksplan tumbuhan (Skoog dan Miller, 1957).

penting untuk fotosintesis dan fotomorfogenesis. Faktor-faktor yang terlibat ini boleh diubahsuai sehingga respons yang terbaik diperolehi. Faktor-faktor penting yang menyumbang kepada kejayaan kultur tisu tumbuhan ialah pemilihan komponen nutrisi dan hormon tumbesaran seperti auksin, sitokin dan giberelin. Di samping itu, pH media, suhu dan keamatan cahaya juga mempengaruhi tumbesaran tumbuhan dalam keadaan *in vitro*. Selain daripada faktor kimia dan fizikal; status fisiologi sumber eksplan juga penting untuk menjamin kejayaan regenerasi tumbuhan (George dan Sherington, 1984).

Dalam kajian ini, eksplan akar yang berumur 7 hari dan panjangnya di antara 18.40mm - 24.50mm (bagi var.MC 4) dan 18.36mm - 24.04mm (bagi var. MC 5) telah dipilih sebagai sumber eksplan. Akar yang dipilih dianggapkan mempunyai tahap fisiologi yang sama atau seragam dengan akar *in vivo*.

Langkah ini diambil untuk mengurangkan variasi yang mungkin wujud di antara akar-akar tersebut, oleh itu perbezaan di antara kelakuan sel *in vivo* dan *in vitro* adalah boleh diterima dan dapat dibezakan dan bandingkan. Tisu dari apeks akar (2mm) digunakan sebagai sumber eksplan untuk mendapatkan regenerasi tumbuhan. Eksplan akar dikultur di atas media MS dan dibekalkan dengan berbagai jenis hormon seperti mana diterangkan dalam bahagian 4.2.2. Berbagai organ vegetatif juga digunakan, seperti hujung pucuk, akar dan batang untuk mendapatkan regenerasi tumbuhan. Alternatif ini dilakukan setelah eksplan akar tidak berjaya menghasilkan regenerasi tumbuhan. Berbagai kombinasi hormon telah digunakan untuk mendapatkan media yang paling

hujung pucuk, akar dan batang untuk mendapatkan regenerasi tumbuhan. Alternatif ini dilakukan setelah eksplan akar tidak berjaya menghasilkan regenerasi tumbuhan. Berbagai kombinasi hormon telah digunakan untuk mendapatkan media yang paling optima bagi kultur akar (Bahagian 4.2.2). Eksplan akar hanya menghasilkan akar dan tiada pembentukan pucuk atau regenerasi tumbuhan lengkap diperhatikan. Walau bagaimanapun, tujuan utama bab ini adalah untuk mendapatkan media optima untuk pembentukan akar.

Kajian sitologi boleh membongkar rahsia regenerasi sesuatu spesies tumbuhan (Clowes, 1971). Kajian dan pemerhatian mengenai aktiviti sel semasa eksperimen kultur tisu, dapat membantu menerangkan bagaimana dan apa keadaan yang sesuai untuk regenerasi berlaku. Menurut pendapat beberapa orang saintis seperti Bennici *et al.*, (1970), Taha dan Francis, (1993); Heinz dan Mee, (1971), perubahan dari segi sitologi boleh wujud dalam sel-sel somatik dalam keadaan *in vitro*. Perubahan sitologi ini mungkin akan menyebabkan terhasilnya sel-sel poliploid dari sel diploid.

Pengumpulan kandungan DNA dalam fasa S menandakan permulaan endomitosis iaitu mekanisme yang meningkatkan tahap poliploidi. Sel-sel yang dikultur mungkin menunjukkan perbezaan dari segi bilangan kromosom berbanding dengan keadaan asal atau keadaan ‘intact’. Dalam bab ini, kajian sitologi ke atas *C. annuum* yang ditanam secara *in vitro* seperti indeks mitosis, bilangan kromosom, masa penggandaan sel, kandungan DNA nukleus dan purata luas sel dan nukleus diperolehi dari akar yang

dikultur selama 1, 2, 3 dan 4 minggu pada suhu $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ dengan 16 jam cahaya dan 8 jam gelap di atas media MS yang ditambah dengan 0.2 mg/l NAA.

Objektif kajian ini adalah untuk membandingkan kelakuan sel dalam sistem *in vivo* dan *in vitro* bagi kedua-dua varieti ini. Data-data yang diperolehi dari sel akar *in vivo* dianggap sebagai data rujukan bagi data *in vitro*. Sebarang perubahan dalam aktiviti sel yang mungkin ditunjukkan oleh parameter-parameter di atas iaitu indeks mitosis, masa penggandaan sel, kandungan DNA nukleus, luas sel dan nukleus serta bilangan kromosom dapat membayangkan perubahan-perubahan yang akan berlaku pada peringkat morfologi.

4.2 BAHAN DAN KADEAH

4.2.1 Penentuan Media Optima Untuk Pembentukan Akar dan Regenerasi Tumbuhan Lengkap.

a) Pensterilan Sumber Eksplan

Cara pensterilan sumber eksplan yang lebih mudah ialah menanamnya di dalam keadaan persekitaran yang aseptik. Embrio yang dilindungi oleh testa adalah sentiasa dalam keadaan steril dan pemilihan eksplan ini akan mengurangkan kadar kontaminasi yang mungkin terjadi. Dalam kajian ini, biji benih disterilkan dengan mencucinya menggunakan air suling sebanyak 3 kali, kemudian direndam dalam larutan natrium hipoklorik 5.0% (v/v) selama 10 minit, diikuti dengan bilasan air suling sebanyak 4 kali. Biji benih seterusnya direndam dalam air suling dan dibiarkan semalam pada suhu 20°C. Selepas direndam, biji benih dibasuh dengan 2.5% (v/v) natrium hipoklorik selama 10 minit. Langkah seterusnya, biji benih dibilas dengan air steril sebanyak 3 kali, kemudian dicelup ke dalam 70% alkohol untuk beberapa saat diikuti dengan membilasnya dengan air steril. Biji benih yang telah dicuci dicambahkan di atas media MS (Murashige dan Skoog, 1962) tanpa hormon selama 7 hari sehingga akar dihasilkan. Eksplan apeks akar tanpa jidal akar diambil dari anak cambah yang steril dan dikultur di atas media MS yang dibekalkan dengan berbagai kombinasi hormon seperti di bahagian 4.2.2.

Sebanyak 30 replika bagi setiap perlakuan dan kultur ini diletakkan di dalam bilik kultur dengan suhu $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ pada 16 jam cahaya dan 8 jam gelap.

b) Penyediaan Media Kultur

Berdasarkan kajian awal sitologi, akar *C. annum* yang ditanam secara *in vivo* iaitu ditanam di atas tanah dan di atas media MS tanpa hormon tidak menunjukkan sebarang perbezaan dari segi aktiviti sel. Oleh itu dalam bab ini, anak-anak cambah yang dikultur di atas media MS atau Murashige dan Skoog (1962) telah digunakan. Media MS digunakan secara meluas dalam kajian ini. Media serbuk ini dilarutkan dalam air suling (kurang 10% dari isipadu akhir media). Bahan-bahan lain seperti sukros, agar dan beberapa kombinasi hormon yang dikehendaki ditambahkan ke dalam media. Setelah itu, isipadu akhir media ditambah menjadi satu liter menggunakan air suling. pH media ditetapkan pada 5.8 menggunakan 0.1N NaOH atau 0.1N HCl. Media ini kemudiannya diautoklaf pada 121°C , 103.4kPa selama 20 minit dan seterusnya dituang ke dalam tiub steril berdiameter 40mm dan 55mm tinggi di bawah keadaan aseptik.

4.2.2 Pemilihan Hormon yang Sesuai

Berbagai jenis hormon telah diuji untuk mendapatkan hormon yang paling sesuai untuk menginduksi akar bagi spesies *C. annum*. Sebanyak 20 kombinasi hormon yang berbeza telah ditambah ke dalam media MS dan di bawah ini adalah senarai media MS

dengan kombinasi hormon tertentu yang telah digunakan dalam kajian ini. Pemilihan ini adalah berdasarkan kepada kajian-kajian terdahulu ke atas spesies yang sama.

1. Media MS + 0.1mg/l IAA
2. Media MS + 0.2mg/l IAA
3. Media MS + 0.3mg/l IAA
4. Media MS + 0.4mg/l IAA
5. Media MS + 0.5mg/l IAA
6. Media MS + 0.6mg/l IAA
7. Media MS + 0.1mg/l IAA + 0.5mg/l BA
8. Media MS + 0.2mg/l IAA + 0.5mg/l BA
9. Media MS + 0.3mg/l IAA + 0.5mg/l BA
10. Media MS + 0.4mg/l IAA + 0.5mg/l BA
11. Media MS + 0.5mg/l IAA + 0.5mg/l BA
12. Media MS + 0.6mg/l IAA + 0.5mg/l BA
13. Media MS + 0.1mg/l IAA + 1.0mg/l BA
14. Media MS + 0.2mg/l IAA + 1.0mg/l BA
15. Media MS + 0.3mg/l IAA + 1.0mg/l BA
16. Media MS + 0.1mg/l IAA + 1.5mg/l BA
17. Media MS + 0.2mg/l IAA + 1.5mg/l BA
18. Media MS + 0.7mg/l IAA
19. Media MS + 0.8mg/l IAA
20. Media MS + 0.9mg/l IAA

4.2.3 Kaedah Percambahan dan Kultur untuk Kajian Sitologi

Biji benih *C. annuum* dicambahkan secara aseptik (Bahagian 2.2). Akar yang berumur 7 hari dengan panjang piawai (18.40mm - 24.5mm bagi var. MC 4 dan 18.36mm - 24.04mm bagi var. MC 5) digunakan dalam kajian ini. Segmen akar sepanjang 1-2mm telah diambil dan dikultur di atas media MS yang dibekalkan dengan 0.2mg/l IAA di mana media ini adalah media yang optima untuk pertumbuhan akar *C. annuum* bagi kedua-dua varieti cili. Kultur akar disimpan selama 1, 2, 3 dan 4 minggu pada suhu $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ dengan 16 jam cahaya dan 8 jam gelap. Sampel-sampel dari kultur ini digunakan untuk penyediaan slaid tetap yang akan digunakan untuk kajian seterusnya.

4.2.4 Pengiraan Nilai Indeks Mitosis (MI) *in vitro*

Akar baru atau akar sekunder yang dihasilkan dari kultur akar diambil selepas 1, 2, 3, 4, 5, 7 minggu dan 6 bulan. Pada setiap penyampelan, 6 akar diawetkan dalam 3:1 (v/v) alkohol : glasial asid asetik. Penyediaan slaid tetap dilakukan seperti yang diterangkan pada bahagian 3.2.1. Bagi setiap masa penyampelan, nilai MI (jumlah profasa, metafasa dan telofasa diambil sebagai peratusan dari jumlah semua sel) ditentukan. Sebanyak seribu sel per slaid bagi setiap waktu penyampelan telah digunakan.

4.2.5 Bilangan kromosom *in vitro*

Akar yang diperolehi dari kultur akar yang berumur 1, 2, 3, 4, 5, 7 minggu dan 6 bulan diawetkan dalam 3:1(v/v) alkohol : glasial asid asetik. Penyediaan slaid tetap dengan pewarnaan Feulgen dijalankan seperti diterangkan pada bahagian 3.2.1. Pengiraan bilangan kromosom dilakukan pada slaid yang mempunyai taburan kromosom yang sesuai sahaja. Sekurang-kurangnya 20 sel pada peringkat metafasa dikira bagi setiap masa penyampelan.

4.2.6 Pengukuran Kandungan DNA Nukleus

Kaedah yang digunakan adalah seperti yang diterangkan dalam bahagian 3.2.4. Akar yang diperolehi dari kultur yang berumur 1, 2, 3, 4, 5, 7 minggu dan 6 bulan dalam media MS yang dibekalkan dengan 0.2mg/l IAA diperlakukan dengan pewarnaan Feulgen untuk dijadikan slaid kekal. Kemudian slaid-slaid ini dikaji di bawah mikroskop cahaya dan dianalisa dengan sistem analisis imej VIDAS 21 oleh Kontron Elektronik sepetimana diterangkan pada bahagian 3.2.4.

4.2.7 Pengukuran Purata Luas Sel dan Nukleus dalam Keadaan *in vitro*

Akar baru atau akar sekunder yang dihasilkan dari kultur akar berumur 1, 2, 3, 4, 5, 7 minggu dan 6 bulan digunakan untuk menyediakan slaid tetap dengan pewarnaan Feulgen bagi pengukuran luas sel dan nukleus. Slaid-slaid ini direndam dalam 0.2% ‘light

green' yang telah dilarutkan dalam etanol (99.9%) selama 6 minit dan direndam semula dalam larutan etanol (99.9%) selama 10 minit. Akhir sekali, slaid-slaid ini dicuci dalam xylene (10 minit) dan seterusnya dilekatkan sisip kaca baru dengan menggunakan DPX (bahagian 3.2.5).

4.2.8 Penentuan Masa Penggandaan Sel (Cdt)

Biji benih *C.annuum* dicambahkan seperti diterangkan pada bahagian 2.1. Akar primer yang berumur 7 hari dengan kepanjangan piawai (18.40mm - 24.50mm bagi var. MC 4 dan 18.36mm - 24.04mm bagi var. MC 5) dikultur di atas media MS yang dibekalkan dengan 0.2mg/l IAA seperti di bahagian 4.2.3. Akar baru yang dihasilkan dari kultur akar (berumur 3 minggu) didedahkan kepada 0.025% larutan kolkisina selama 7 jam. Pemilihan akar yang berumur 3 minggu ini adalah berdasarkan kepada nilai MI yang tertinggi yang direkodkan. Pada setiap jam, sekurang-kurangnya 6 akar di awet dalam 3:1 (v/v) alkohol : glasial asid asetik. Slaid tetap disediakan seperti pada bahagian 3.2.1 dan diperiksa di bawah mikroskop. Peratus sel yang sedang mengalami profasa dan metafasa ditentukan. Sebagai kawalan, 6 akar juga diawetkan pada 0 jam, dijadikan slaid tetap dan ditentukan nilai profasa serta metafasanya.

4.3 KEPUTUSAN

Pemerhatian Keseluruhan Terhadap Kultur Akar

Tujuan utama eksperimen ini dijalankan adalah untuk melihat respons *C. annuum* varieti MC 4 dan MC 5 kepada media yang mempunyai komposisi hormon yang berbeza di samping untuk mendapatkan regenerasi tumbuhan lengkap. Kebanyakan regenerasi *C. annuum* yang telah berjaya diperolehi melalui teknik kultur tisu adalah menggunakan media MS yang telah diubahsuai atau ditambah dengan berbagai kombinasi hormon. Contohnya Montero dan Alejo (1992) telah memperolehi regenerasi *C. annuum* dari hipokotil setelah media MS ditambah dengan BA (benziladenin) dan indol asetik asid (IAA). Robert *et al.*, (1986) pula menggunakan media MS untuk mengkaji kestabilan kultur tisu terhadap pH, masa dan bahan kultur ke atas famili Solanaceae. Frekuensi regenerasi yang tinggi diperolehi dari protoplas tomato, juga menggunakan media MS (Patil *et al.*, 1994).

Berdasarkan kepada contoh-contoh di atas, media MS telah dipilih untuk digunakan dalam kajian ini. Media MS yang digunakan ditambah dengan kombinasi dan kepekatan hormon yang berbeza. Media MS tanpa hormon digunakan sebagai media kawalan. Segmen akar boleh meneruskan tumbesarananya di atas media tanpa hormon tetapi tidak membentuk akar baru. Pertambahan hormon seperti auksin dijangka akan menghasilkan akar. Walaupun begitu, daripada 20 kombinasi hormon yang diuji kebanyakannya membentuk kalus atau tiada respons dari eksplan akar (Jadual 1). Hanya

Jadual 1 : Respons eksplan akar *Cannuum* var. MC 4 dan MC 5 terhadap pelbagai kombinasi hormon

Media MS	Respons var MC 4	Respons var MC 5
1. Tanpa hormon	Pemanjangan akar	Pemanjangan akar
2. 0.1 mg/l IAA	Kalus (72%)	Kalus (70%)
3. 0.2 mg/l IAA	Pembentukan akar(85%)	Pembentukan akar(85%)
4. 0.3 mg/l IAA	Kalus (70%)	Kalus (65%)
5. 0.4 mg/l IAA	Kalus (20%)	Kalus (25%)
6. 0.5 mg/l IAA	Kalus (36%)	Kalus (30%)
7. 0.6 mg/l IAA	Kalus (30%)	Kalus (35%)
8. 0.1 mg/l IAA + 0.5 mg/l BA	Pembentukan akar(60%)	Pembentukan akar(62%)
9. 0.2 mg/l IAA + 0.5 mg/l BA	Kalus (30%)	Kalus (35%)
10. 0.3 mg/l IAA + 0.5 mg/l BA	Pembentukan akar(50%)	Pembentukan akar(45%)
11. 0.4 mg/l IAA + 0.5 mg/l BA	Kalus (50%)	Kalus (55%)
12. 0.5 mg/l IAA + 0.5 mg/l BA	Kalus (30%)	Kalus (33%)
13. 0.6 mg/l IAA + 0.5 mg/l BA	Kalus (30%)	Kalus (35%)
14. 0.1 mg/l IAA + 1.0 mg/l BA	Kalus (50%)	Kalus (55%)
15. 0.2 mg/l IAA + 1.0 mg/l BA	Kalus (25%)	Kalus (20%)
16. 0.3 mg/l IAA + 1.0 mg/l BA	Kalus (24%)	Kalus (20%)
17. 0.1 mg/l IAA + 1.5 mg/l BA	Kalus (25%)	Kalus (25%)
18. 0.2 mg/l IAA + 1.5 mg/l BA	Kalus (33%)	Kalus (35%)
19. 0.7 mg/l IAA	Kalus (30%)	Kalus (25%)
20. 0.8 mg/l IAA	Kalus (25%)	Kalus (20%)
21. 0.9 mg/l IAA	Kalus (33%)	Kalus (30%)

pada media MS yang mengandungi 0.2 mg/l IAA; media MS dengan 0.2 mg/l IAA + 0.5 mg/l BA dan media MS dengan 0.3 mg/l IAA + 0.5 mg/l BA menghasilkan pembentukan akar baru. Sungguhpun begitu, pembentukan akar pada media MS yang ditambah dengan 0.2 mg/l IAA dan 0.5 mg/l BA; media MS dengan 0.3 mg/l IAA dan 0.5 mg/l BA adalah dalam kuantiti yang rendah (45-50%). Hanya media MS yang mengandungi 0.2 mg/l IAA sahaja menunjukkan penghasilan akar baru yang banyak dan sihat (85% bagi var. MC 4 dan MC 5).

Kalus yang terbentuk dari eksplan akar di atas media MS yang ditambah dengan hormon IAA dan BA merupakan kalus berwarna putih kekuningan dan tiada potensi untuk penghasilan regenerasi. (Jadual 1)

4.3.1 Indeks mitosis (MI)

Kajian sitologi sel meristem akar yang ditanam secara *in vitro* melibatkan akar di dalam kultur. Akar baru yang dibentuk dari eksplan akar yang dikultur di atas media MS yang ditambah dengan 0.2 mg/l IAA digunakan untuk menyediakan slaid tetap. Nilai MI bagi akar *in vitro* bagi var. MC 4 adalah $21.63 \pm 1.10\%$ berbanding dengan $20.56 \pm 1.95\%$ dari akar yang ditanam secara *in vivo*. Pada minggu kedua di dalam kultur, nilainya meningkat sehingga $39.50 \pm 1.02\%$, seterusnya menjadi $65.25 \pm 2.50\%$ pada minggu ketiga. Ini merupakan nilai MI tertinggi yang direkodkan.

Pada minggu keempat nilai MI menurun semula ($45.65 \pm 0.92\%$), menjadi $43.25 \pm 0.82\%$ pada minggu kelima dan $30.02 \pm 0.97\%$ pada minggu ketujuh. Setelah 6 bulan di dalam kultur nilai MI menjadi lebih rendah iaitu $12.16 \pm 0.43\%$. Nilai-nilai ini adalah berbeza dengan bererti ($p < 0.05$) (Jadual 2).

Nilai indeks mitosis (MI) bagi var. MC 5 selepas seminggu di dalam kultur ialah $37.37 \pm 5.84\%$, minggu kedua $31.10 \pm 3.00\%$ tetapi meningkat sehingga $74.90 \pm 3.3\%$ pada minggu ketiga. Nilai ini menurun semula pada minggu keempat ($18.97 \pm 0.76\%$), $18.73 \pm 0.73\%$ pada minggu kelima, $15.29 \pm 1.23\%$ pada minggu ketujuh dan $15.29 \pm 1.20\%$ selepas enam bulan di dalam kultur (Jadual 2).

Dalam kajian ini, nilai indeks mitosis (MI) bagi kedua-dua var. MC 4 dan MC 5 semakin bertambah dengan peningkatan umur kultur pada peringkat awal sehingga minggu keempat. Ini adalah selaras dengan keputusan yang diperolehi oleh Yeoman *et al.* (1965) terhadap *Helianthus tuberosus*. Mereka telah menunjukkan terdapat pertambahan nilai MI secara mendadak pada peringkat awal kultur (selepas 48 jam), tetapi nilai ini kembali menurun apabila tisu tumbuhan dibiarkan terlalu lama di dalam keadaan *in vitro*. Keputusan yang sama juga diperolehi dalam kajian ini di mana nilai MI yang tinggi ($74.90 \pm 3.3\%$) pada minggu ketiga, tetapi menurun semula pada minggu keempat ($18.97 \pm 0.76\%$). Perubahan persekitaran kultur iaitu dari keadaan *in vivo* kepada keadaan *in vitro* telah mengubah aktiviti sel termasuklah kadar pembahagian sel (Armstrong dan Francis, 1985).

Jadual 2 : Nilai MI bagi akar 'intact' dan akar *in vitro* *C.annuum* var. MC 4 dan MC 5 dikultur di atas media MS dengan 0.2 mg/l IAA di bawah keadaan $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ dengan 16 jam cahaya dan 8 jam gelap

Tempoh kultur (minggu)	Nilai MI (%) \pm SE	
	MC 4	MC 5
0 (akar 'intact')	20.56 ± 1.95	22.11 ± 1.26
1	21.63 ± 1.10	37.37 ± 5.84
2	39.50 ± 1.02	31.10 ± 3.00
3	65.25 ± 2.50	74.90 ± 3.33
4	45.65 ± 0.92	18.97 ± 0.76
5	43.25 ± 0.82	18.73 ± 0.73
7	30.02 ± 0.97	15.29 ± 1.23
6 bulan	12.16 ± 0.43	15.29 ± 1.23

Jadual 3 : Bilangan kromosom dari sel metaphase eksplan akar *C.annuum* var. MC4 dan MC 5 selepas 1, 2, 3, 4, 5, 7 minggu dan 6 bulan dikultur di atas media MS yang ditambah dengan 0.2 mg/l IAA pada $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ dengan 16 jam cahaya dan 8 jam gelap

Tempoh kultur (minggu)	Purata bilangan kromosom		Julat bilangan kromosom	
	MC 4	MC 5	MC 4	MC 5
1	24	24	21-24	20-25
2	24	24	20-25	21-26
3	24	24	20-25	22-25
4	24	24	20-24	21-24
5	24	24	24-25	20-25
7	24	24	22-24	19-25
6 bulan	24	24	20-25	19-25

4.3.2 Bilangan Kromosom

C.annuum var. MC 4 dan MC 5 tidak menunjukkan sebarang perubahan dari segi bilangan kromosom apabila berada di dalam keadaan *in vitro*. Bagi var. MC 4, bilangan kromosomnya tetap 24 dengan julatnya 21-24. Nilai ini adalah sama dengan bilangan kromosom pada minggu kedua, ketiga, keempat, kelima dan seterusnya bulan keenam. Bilangan kromosom yang sama juga diperhatikan pada var. MC 5 (Jadual 3)

4.3.3 Purata Luas Sel dan Nukleus

Purata luas sel bagi sel-sel meristem akar var. MC 4 yang ditanam secara *in vivo* adalah $261.43 \pm 6.56 \mu\text{m}^2$ tetapi mengecil setelah seminggu di dalam kultur iaitu menjadi $260.95 \pm 6.19 \mu\text{m}^2$ tetapi perubahan ini adalah tidak bererti pada $p > 0.05$. Purata luas nukleus adalah hampir sama iaitu $74.70 \pm 1.57 \mu\text{m}^2$ bagi sel-sel akar 'intact' menjadi $74.67 \pm 1.78 \mu\text{m}^2$ dalam keadaan *in vitro* (Rajah 8a dan 8b, Apendiks II). Dalam kes ini perubahan luas sel dan nukleus adalah bersandar antara satu sama lain. Sungguhpun begitu, bagi var. MC 5 purata luas sel meristem akar berkurang setelah seminggu ($176.86 \pm 1.51 \mu\text{m}^2$), dua minggu ($179.64 \pm 1.75 \mu\text{m}^2$) dan tiga minggu ($179.92 \pm 1.60 \mu\text{m}^2$) di dalam kultur. Nilai ini meningkat menjadi lebih tinggi pada minggu keempat ($192.83 \pm 2.31 \mu\text{m}^2$), kelima ($195.21 \pm 2.30 \mu\text{m}^2$), ketujuh ($195.00 \pm 2.11 \mu\text{m}^2$) sehingga enam bulan ($198.12 \pm 2.10 \mu\text{m}^2$) di dalam kultur (Jadual 4). Walaupun terdapat pertambahan saiz sel pada minggu keempat ($192.83 \pm 2.31 \mu\text{m}^2$) tetapi nilai ini masih lebih kecil dari saiz sel akar

Jadual 4 : Purata luas sel dan nukleus bagi sel-sel akar *C.annuum* var. MC 5 yang dikultur di atas media MS dengan 0.2 mg/l IAA di bawah keadaan 25 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ dan diberi 16 jam cahaya dan 8 jam gelap.

Tempoh kultur (minggu)	Luas (μm^2) \pm SE	
	Sel	Nukleus
0 (akar 'intact')	265.82 ± 3.42	69.82 ± 2.65
1	176.86 ± 1.51	77.23 ± 1.59
2	179.64 ± 1.75	62.42 ± 1.42
3	179.92 ± 1.60	60.31 ± 1.55
4	192.83 ± 2.31	72.25 ± 2.30
5	195.21 ± 2.30	70.15 ± 3.00
7	195.0 ± 2.11	69.25 ± 2.31
6 bulan	198.12 ± 2.10	72.32 ± 3.00

tumbuhan 'intact' ($265.82 \pm 3.42 \mu\text{m}^2$) (Rujuk Rajah 9a, 9b, 10a, 10b, 11a, 11b, 12a, 12b, 13a, 13b, 14a, 14b 15a dan 15b, dalam Apendiks II).

Perubahan purata saiz nukleus *in vitro* pada keseluruhannya adalah tidak signifikan ($p > 0.05$) berbanding dengan saiz nukleus sel *in vivo*. Pada minggu kedua dan ketiga menunjukkan perbezaan saiz nukleus tetapi masih tidak signifikan ($p > 0.05$) iaitu $62.42 \pm 1.26 \mu\text{m}^2$ pada minggu kedua dan $60.31 \pm 0.15 \mu\text{m}^2$ pada minggu ketiga. Didapati bahawa perubahan saiz sel dan nukleus adalah tidak bersandar. Selepas enam bulan di dalam kultur, saiz sel menjadi $198.12 \pm 4.10 \mu\text{m}^2$ dan saiz nukleus adalah $72.32 \pm 1.96 \mu\text{m}^2$. Pertambahan saiz sel dan nukleus ini adalah berbeza dengan berertinya dengan saiz sel 'intact' di mana saiz selnya adalah $265.82 \pm 3.42 \mu\text{m}^2$ dan saiz nukleus pula ialah $69.82 \pm 1.30 \mu\text{m}^2$ ($p < 0.05$).

Nisbah luas nukleus kepada luas sel pada minggu pertama di dalam keadaan *in vitro* ialah 0.41 tetapi berkurang pada minggu kedua menjadi 0.36 dan 0.33 pada minggu ketiga. Nisbah ini bertambah semula pada minggu keempat iaitu 0.41 tetapi berkurang semula kepada 0.36 pada minggu kelima, ketujuh dan 6 bulan.

Secara amnya, purata luas sel dan nukleus adalah lebih rendah apabila sel diletakkan dalam keadaan *in vitro* untuk tempoh yang singkat (1, 2 dan 3 minggu). Walaupun begitu, saiz sel dan nukleus bertambah jika dibiarkan lebih lama di dalam kultur (4, 5, 7 minggu dan 6 bulan). Pengukuran luas sel dan nukleus sel akar *in vitro* pada jangka masa yang lebih lama (2, 3, 4, 5 minggu dan 6 bulan) hanya dilakukan

terhadap *C. annuum* var. MC 5 sahaja kerana tiada perbezaan yang signifikan ($p > 0.05$) di antara var. MC 4 dan MC 5.

4.3.4 Masa Penggandaan Sel (Cdt)

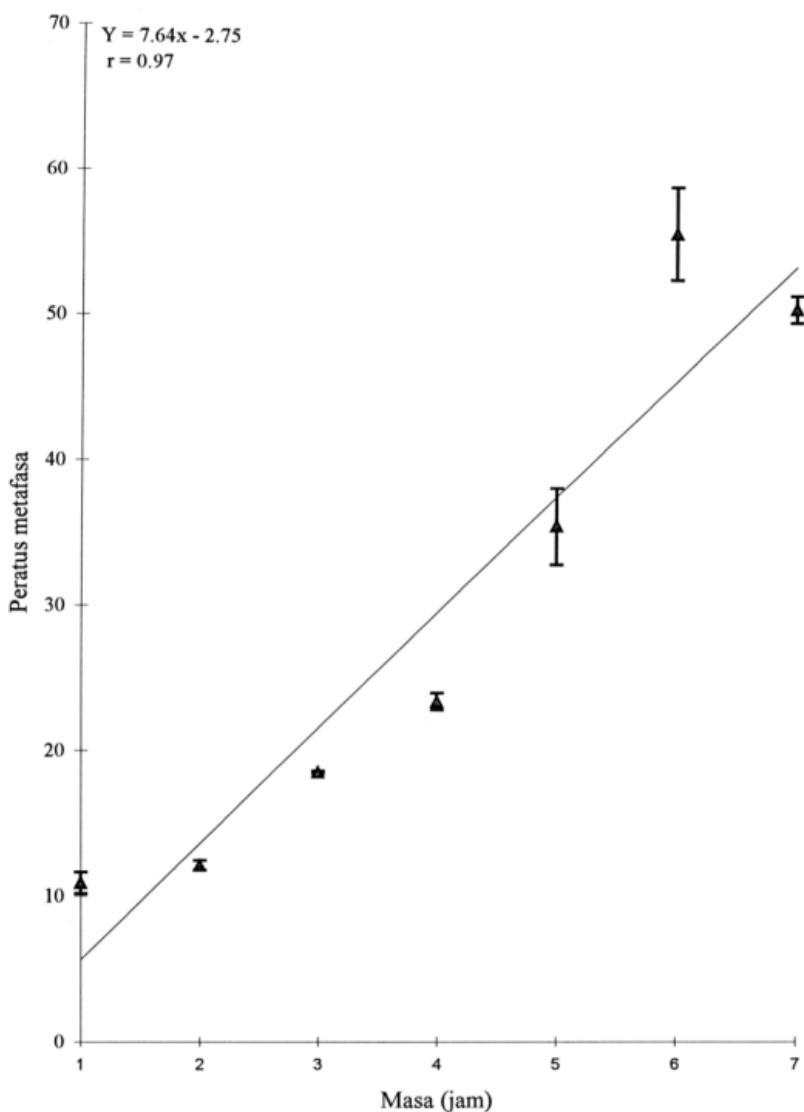
Masa penggandaan sel (Cdt) dikira dari sel akar yang dikultur selama tiga minggu. Ini adalah berdasarkan nilai indeks mitosis (MI) yang tinggi diperolehi pada akar yang berumur tiga minggu. Persamaan $Y = 7.64X - 2.75$ memberikan nilai Cdt sebagai 9.07 jam bagi var. MC 5. Tempoh ini adalah lebih singkat dari nilai Cdt akar *in vivo* iaitu 15.07 jam (Rajah 16a). Bagi var. MC 4 pula nilai Cdt adalah 8.16 jam berbanding dengan 24.39 jam pada akar *in vivo* (Rajah 16b).

Keputusan-keputusan di atas menunjukkan sel-sel meristem akar *in vitro* *C. annuum* var. MC 4 dan MC 5 mengambil masa yang lebih singkat berbanding dengan sel *in vivo* untuk menggandakan populasinya.

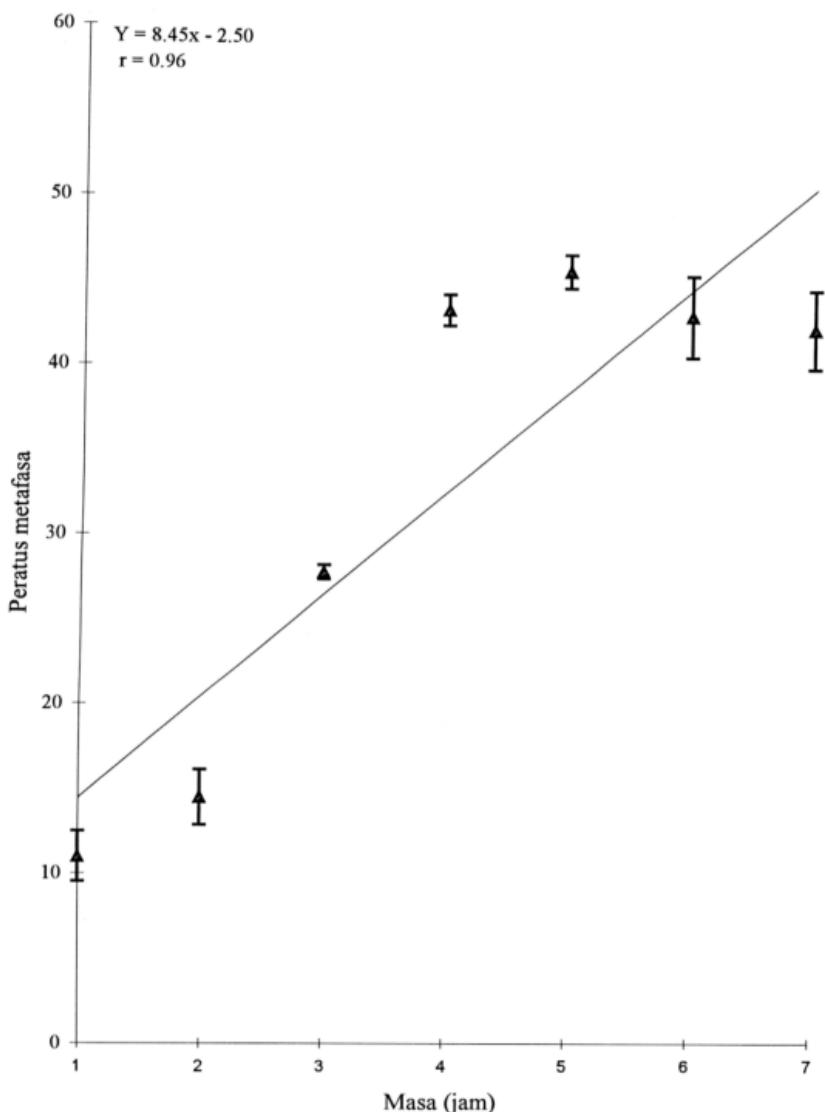
4.3.5 Pengukuran Kandungan DNA Nukleus

Selepas seminggu di dalam kultur, kandungan DNA nukleus sel akar *C. annuum* var. MC 5 menunjukkan perubahan berbanding dengan kandungan DNA nukleus bagi tumbuhan yang ditanam secara *in vivo*. Merujuk kepada Jadual 5, kebanyakan daripada sel iaitu 78% kandungan DNanya melebihi nilai 4.8C dan tiada sel yang berada di dalam

Rajah 16a : Perkaitan di antara peratus frekuensi metafasa dan tempoh dedahan kepada 0.025% kolonisir bagi sel-sel akar primer *C. annuum* var. MC 5 yang ditanam secara *in vitro* pada suhu $25 \pm 1^\circ\text{C}$ dan diberi 16 jam cahaya dan 8 jam gelap.



Rajah 16b : Perkaitan di antara peratus frekuensi metafasa dan tempoh dedahan kepada 0.025% ~~kokisina~~ bagi sel-sel akar primer *C. annumum* var. MC 4 yang ditanam secara *in vitro* pada suhu $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ dan diberi 16 jam cahaya dan 8 jam gelap.



yang berada di dalam fasa G1. Pada minggu kedua, bilangan sel di dalam fasa G2 bertambah menjadi 17.3% berbanding dengan 9.3% pada minggu pertama (Rajah 19, Apendediks II). Kebanyakan sel akar *in vitro* yang berumur 3 minggu di dalam kultur mempunyai kandungan DNA di antara 2.2-3.6C (fasa S) iaitu 34.2%, 33.2% sel-sel berada pada fasa G2 dan peratus sel yang menjadi poliploid berkurang menjadi 32.1% (Rajah 20, Apendediks II). Keadaan ini hampir sama dengan peratus sel pada minggu keempat dan kelima (Rajah 21 dan 22, Apendediks II). Pada minggu ketujuh, sel-sel yang berada pada fasa S dan G2 berkurang iaitu menjadi 12.5% dan 9.4% tetapi bilangan sel poliploidi bertambah (78.1%) (Rajah 23, Apendediks II).

Selepas enam bulan di dalam kultur, kandungan DNA sel akar ini hampir sama dengan sel akar yang berumur dua minggu iaitu, 11.8% (2.2-3.6C), 17.3% (3.6-4.8C) dan 70.9% poliploidi (Rajah 24). Tahap ploidi yang paling tinggi adalah 14C iaitu pada minggu kedua dan diikuti oleh 12C pada minggu pertama, ketujuh dan selepas enam bulan di dalam keadaan *in vitro*.

Jadual 5 : Peratus sel-sel akar *C. annuum* var. MC 5 pada fasa G1, S, G2 dan poliploidi selepas dikultur di atas media MS dengan 0.2 mg/l IAA di bawah keadaan $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ dan diberi 16 jam cahaya dan 8 jam gelap

Tempoh kultur (minggu)	Peratus sel (%)			Poliploidi
	G1	S	G2	
1	0	12.7	9.3	78.0
2	0	11.9	17.3	70.8
3	0	34.2	33.7	32.1
4	0	32.0	34.7	33.3
5	0	33.0	33.7	33.3
7	0	12.5	9.4	78.1
6 bulan	0	11.8	17.3	70.9

4.4 RINGKASAN KEPUTUSAN

1. Pada umumnya nilai MI bagi sel-sel akar *C. annum* yang ditanam dalam keadaan *in vitro* adalah lebih tinggi dari sel-sel akar yang ditanam dalam keadaan *in vivo*, tetapi nilai ini berkurang jika terlalu lama di dalam kultur. Nilai MI yang tertinggi direkodkan pada minggu ketiga pengkulturan (var. MC 4) iaitu sebanyak $65.25 \pm 2.50\%$. Bagi var. MC 5, nilai MI bagi sel-sel akar *in vitro* lebih tinggi ($37.37 \pm 5.84\%$) dari sel-sel akar *in vivo* pada minggu pertama ($22.11 \pm 1.26\%$), kedua ($31.10 \pm 3.00\%$) dan ketiga ($74.90 \pm 3.33\%$) sahaja tetapi menurun pada minggu keempat ($18.97 \pm 0.76\%$), kelima ($18.73 \pm 0.73\%$), ketujuh ($15.29 \pm 1.23\%$) dan bulan keenam ($15.29 +1.23\%$).
2. Bilangan kromosom bagi kedua-dua varieti MC 4 dan MC 5 adalah agak stabil walaupun dikultur pada tempoh yang panjang. Bilangan kromosom bagi sel-sel akar *in vitro* sama dengan bilangan kromosom dalam akar-akar *in vivo* ($2n = 2x = 24$) pada julat 19-26 (var. MC 5) dan 20-25 (var. MC 4).
3. Purata saiz sel bagi akar *C. annum* yang ditanam secara *in vitro* adalah lebih kecil dari sel akar yang ditanam secara *in vivo* jika tempoh pengkulturan singkat (1, 2, dan 3 minggu). Pertambahan saiz sel bagi sistem *in vitro* diperolehi pada sel akar yang berumur 4, 5, 7 minggu dan 6 bulan di dalam kultur.
4. Masa penggandaan sel (Cdt) bagi *C. annum* var. MC 4 dan MC 5 dalam keadaan

in vitro adalah lebih singkat daripada dalam keadaan *in vivo* iaitu 8.16 jam bagi var. MC 4 dan 9.07 jam bagi var. MC 5.

5. Taburan kandungan DNA bagi sel-sel *in vitro* pada fasa G1, S dan G2 adalah berbeza dengan taburan kandungan DNA bagi sel-sel *in vivo*. Kebanyakan sel *in vitro* berada dalam fasa S dan G2. Tempoh yang terlalu lama di dalam kultur menyebabkan populasi sel poliploidi bertambah.