

## **BAB 5**

***REGENERASI TUMBUHAN  
LENGKAP C. annum var. MC 4  
DAN MC 5 DALAM SISTEM  
KULTUR TISU***

## BAB 5

### REGENERASI TUMBUHAN LENGKAP *Cannuum* var. MC 4 DAN MC 5 DALAM SISTEM KULTUR TISU

#### 5.1 TUJUAN EKSPERIMEN

Teknik kultur sel dan tisu merupakan satu pendekatan baru untuk memperbaiki mutu tanaman ( Basri dan Alang, 1985 ). Kaedah ini digunakan sebagai alternatif untuk mendapatkan regenerasi pokok lengkap secara pesat, mengurangkan penggunaan biji benih sebagai sumber eksplan, menghasilkan tumbuhan yang bebas dari penyakit dan lain-lain. Penggunaan bahagian-bahagian vegetatif seperti daun, batang, petiol, pucuk dan akar sebagai sumber eksplan dalam teknik kultur tisu merupakan satu langkah untuk mendapatkan tumbuhan baru yang bebas penyakit. Cebisan-cebisian kecil eksplan ini akan dapat mengurangkan kebarangkalian pembiakan tumbuhan berpenyakit. Contohnya Arroyo dan Revilla (1991) telah menggunakan hipokotil dan kotiledon sebagai sumber eksplan untuk mendapatkan regenerasi *C. annuum* cvs. Pico dan Piquillo yang bebas penyakit.

*C. annuum* ditanam dan digunakan secara meluas sebagai rempah dan sayur-sayuran segar terutamanya di kawasan tropika. Walau bagaimanapun, *C. annuum* merupakan spesies yang mudah dijangkiti penyakit terutamanya disebabkan oleh

virus ( Yoon *et al.*, 1989). Memandangkan penggunaan dan pasaran yang meluas ini, berbagai kaedah digunakan untuk memperbaiki mutu penghasilan cili.

Penghibridan somatik merupakan satu kaedah untuk mendapatkan tumbuhan yang resistan kepada penyakit, di mana kaedah ini perlu dilakukan di dalam keadaan *in vitro* (Whithers, 1991). Kultur anter cili digunakan untuk menambahkan frekuensi penghasilan tumbuhan haploid yang mana seterusnya menghasilkan tumbuhan diploid untuk memperluaskan lagi variasi. Selain daripada itu, kultur anter ini digunakan untuk mengembangkan genotip tak spesifik yang seterusnya membolehkan penghasilan tumbuhan haploid dari germplasma ( Mak dan Maheswary, 1992 ).

Tujuan eksperimen dalam bab 5 ini adalah untuk mendapatkan eksplan yang paling regeneratif dan media yang paling optima untuk penghasilan regenerasi tumbuhan lengkap *C. annuum* var. MC 4 dan MC 5. Oleh kerana tiada regenerasi diperolehi dari eksplan akar, maka sumber-sumber eksplan lain seperti daun, batang, pucuk dan petiol digunakan untuk mendapatkan regenerasi tumbuhan. Sekiranya keputusan yang baik diperolehi, adalah diharapkan penghasilan cili varieti tempatan ini akan dapat dipertingkatkan lagi melalui kaedah kultur tisu.

## **5.2 BAHAN DAN KAEDAH**

Biji benih *C. annuum* var. MC 4 dan MC 5 dicambahkan secara aseptik sepermama telah diterangkan pada bahagian 2.2 di atas media MS tanpa hormon. Anak pokok yang berumur dua minggu digunakan sebagai sumber eksplan batang, daun, petiol dan pucuk. Eksplan-eksplan ini dipotong kepada 5 x 5 mm dan dikultur di atas media MS yang ditambah dengan pelbagai kombinasi (bahagian 5.2.1) dan kepekatan hormon yang berbeza (bahagian 5.2.2). Kultur ini disimpan di bawah keadaan 16 jam cahaya dan 8 jam gelap pada suhu  $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

### **5.2.1 Pemilihan hormon yang sesuai**

Pelbagai kombinasi hormon telah diuji untuk mendapatkan regenerasi tumbuhan lengkap *C. annuum* bagi kedua-dua var. MC 4 dan MC 5. Dua puluh media dengan berbagai kombinasi hormon telah digunakan. Berikut adalah senarai media tersebut yang mana pemilihannya adalah berdasarkan kajian-kajian terdahulu terhadap spesies yang sama.

1. Media MS tanpa hormon ( sebagai kawalan )
2. Media MS + 0.1 mg/l IAA
3. Media MS + 0.2 mg/l IAA
4. Media MS + 0.3 mg/l IAA
5. Media MS + 0.4 mg/l IAA

6. Media MS + 0.1 mg/l IAA + 0.5 mg/l BA
7. Media MS + 0.2 mg/l IAA + 0.5 mg/l BA
8. Media MS + 0.1 mg/l IAA + 1.0 mg/l BA
9. Media MS + 0.5 mg/l IAA + 5.0 mg/l BA
10. Media MS + 0.9 mg/l IAA + 0.9 mg/l BA
11. Media MS + 1.0 mg/l IAA + 4.0 mg/l BA
12. Media MS + 1.0 mg/l IAA + 5.5 mg/l BA
13. Media MS + 1.5 mg/l IAA + 5.5 mg/l BA
14. Media MS + 0.9 mg/l IAA + 6.0 mg/l BA
15. Media MS + 1.5 mg/l IAA + 6.0 mg/l BA
16. Media MS + 0.2 mg/l NAA
17. Media MS + 0.2 mg/l NAA + 1.0 mg/l BA
18. Media MS + 0.2 mg/l NAA + 1.5 mg/l BA
19. Media MS + 0.5 mg/l 2,4-D
20. Media MS + 0.5 mg/l 2,4-D + 1.0 mg/l BA
21. Media MS + 1.0 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l BA

### **5.2.2 Pemilihan Hormon pada Kepakatan Berbeza**

Merujuk kepada bahagian 5.2.1, media MS yang dibekalkan dengan hormon IAA sahaja dan kombinasi hormon IAA dan BA merupakan media yang telah dikenal pasti berpotensi untuk menghasilkan regenerasi tumbuhan cili. Media MS dengan

kepekatan hormon yang berbeza juga digunakan untuk memerhatikan samada ia lebih berpotensi untuk penghasilan regenerasi tumbuhan.

### **5.3 KEPUTUSAN**

#### **Pemerhatian Umum Terhadap Kultur**

Kebanyakan eksplan yang digunakan berpotensi untuk membentuk kalus. Pembentukan pucuk secara organogenesis dari eksplan petiol (Plat 2a dan 2d), pucuk (Plat 2b) dan batang (Plat 2c) *C. annuum* var. MC 4 dan MC 5 diperolehi dari media MS yang dibekalkan dengan 0.2 mg/l IAA sahaja . Eksplan daun menginduksikan pucuk berganda di atas media MS yang mengandungi kombinasi hormon IAA dan BA iaitu 1.0 mg/l IAA dengan 4.0 mg/l BA; 0.5 mg/l IAA bersama 5.0 mg/l BA dan 1.5 mg/l IAA dengan 6.0 mg/l BA (Plat 3).

Eksplan batang, akar, pucuk dan petiol yang dikultur di atas media MS yang mengandungi 0.2 mg/l NAA menginduksikan kalus dalam kuantiti yang rendah iaitu eksplan batang 15%, eksplan daun 15% juga, eksplan pucuk 10% dan eksplan petiol 15%. Manakala media MS yang mengandungi 0.2 mg/l NAA dengan 1.0 mg/l BA dan 0.2 mg/l NAA dengan 1.5 mg/l BA tidak menunjukkan sebarang respons terhadap semua eksplan yang digunakan ( eksplan batang, daun, petiol dan pucuk ).

Penambahan 0.5 mg/l 2,4-D kepada media MS menginduksikan kalus dari semua eksplan ( batang, daun, pucuk dan petiol ). Pembentukan kalus dari eksplan-eksplan ini adalah sangat sedikit (kurang dari 10%). Respons yang sama diperolehi



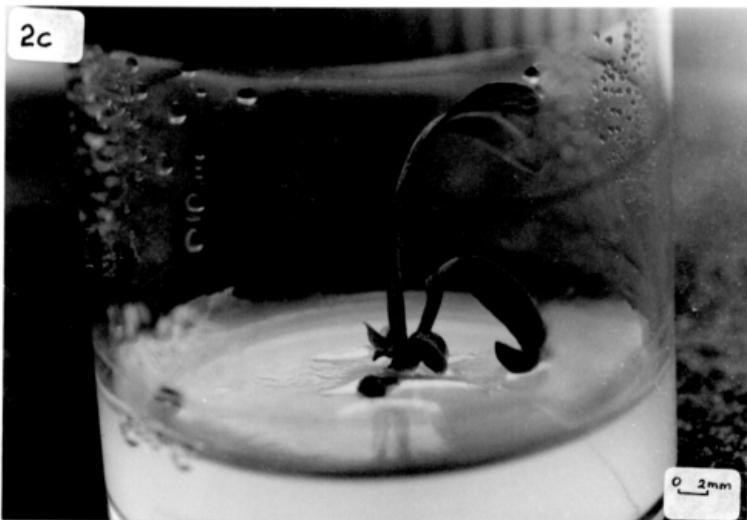
2a



2b



2c



2d





Plat 3 : Regenerasi tumbuhan lengkap *C.annuum* melalui pembentukan pucuk berganda dari eksplan daun yang dikultur di atas media MS yang ditambah dengan 1.0 mg/l IAA dan 4.0 mg/l BA selepas 6 minggu.

dari eksplan yang dikultur di atas media MS yang ditambah dengan 0.5 mg/l 2,4-D bersama 1.0 mg/l BA dan 1.0 mg/l 2,4-D dengan 0.5 mg/l BA (Jadual 6).

Media MS yang mengandungi 0.2 mg/l IAA merupakan media yang paling optima untuk menginduksikan regenerasi dari eksplan batang, pucuk dan petiol. Peratus regenerasi dari eksplan petiol di atas media ini ialah 50%, eksplan pucuk 80% dan eksplan batang menghasilkan 80% regenerasi tumbuhan lengkap bagi *C. annuum* var. MC 4 dan MC 5. Eksplan petiol membentuk plantlet lengkap selepas 2 minggu sahaja di dalam kultur dan kemudian plantlet ini dipindahkan ke tanah setelah berusia 2 bulan. Selepas plantlet berumur 4 bulan, plantlet ini mengeluarkan bunga dan seterusnya berbuah 2 minggu kemudian. Plantlet yang dihasilkan dari eksplan pucuk di atas media yang sama juga telah berjaya dipindahkan ke tanah dan menghasilkan buah (Plat 4, 5, dan 6). Eksplan batang memerlukan masa yang agak lama (3 minggu) untuk membentuk plantlet. Walaupun begitu, regenerasi tumbuhan dari eksplan batang ini mengeluarkan buah pada usia 6 bulan juga.

Pengkulturan eksplan petiol, batang, daun dan pucuk di atas media MS yang dibekalkan dengan 0.1 mg/l IAA hanya menghasilkan kalus yang berwarna putih kekuningan dan tiada potensi untuk menghasilkan regenerasi. Peratus pembentukan kalus dari eksplan petiol ialah 20%, eksplan batang juga 20% dan eksplan daun 35%. Bagi eksplan pula, pembentukan kalus adalah amat sedikit iaitu kurang dari 10%.

**Jadual 6 : Kesan kombinasi hormon IAA dan BA pada kepekatan berbeza dalam media MS ke atas *C. annuum* var. MC 5 yang dikultur pada suhu  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  serta diberi 16 jam cahaya dan 8 jam gelap.**

Media MS + IAA mg/l BA mg/l	Eksplan	Respons	Peratus (%) Pembentukan
0.1 IAA 0 BA	Batang	Kalus	20
	Daun	Kalus	35
	Petiol	Kalus	20
	Pucuk	Kalus	25
0.2 IAA 0 BA	Batang	Plantlet	80
	Daun	Kalus	35
	Petiol	Plantlet	50
	Pucuk	Plantlet	80
0.3 IAA 0 BA	Batang	Kalus	20
	Daun	Kalus	35
	Petiol	Plantlet	30
	Pucuk	Kalus	25
0.4 IAA 0 BA	Batang	Kalus	15
	Daun	Kalus	10
	Pucuk	Kalus	15
	Petiol	Kalus	15
0.1 IAA 0.5 BA	Batang	Kalus	30
	Daun	Kalus	25
	Pucuk	Kalus	15
	Petiol	Kalus	25
0.2 IAA 0.5 BA	Batang	Kalus	20
	Daun	Kalus	20
	Pucuk	Kalus	15
	Petiol	Kalus	25
0.1 IAA 1.0 BA	Batang	Akar	10
	Daun	Akar	8
	Pucuk	Akar	10
	Petiol	Akar	10
0.5 IAA 5.0 BA	Batang	Pucuk berganda	30
	Daun	Pucuk berganda	25
	Pucuk	Kalus	15
	Petiol	Kalus	15
0.9 IAA 0.9 BA	Batang	Kalus	25
	Daun	Kalus	15
	Pucuk	Kalus	20
	Petiol	Kalus	10

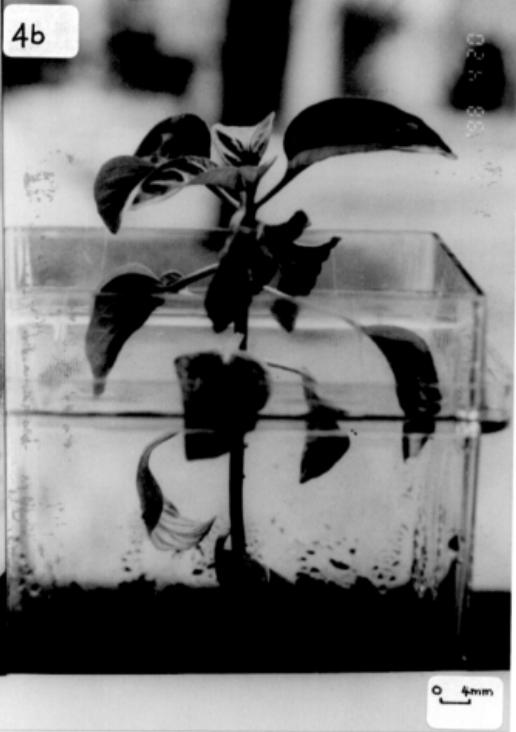
1.0 IAA 4.0 BA	Batang Daun Pucuk Petiol	Kalus Pucuk berganda Kalus Kalus	35 80 40 20
1.0 IAA 5.5 BA	Batang Daun Pucuk Petiol	Kalus Kalus Kalus Kalus	20 25 10 15
1.5 IAA 5.5 BA	Batang Daun Pucuk Petiol	Kalus Kalus Kalus Kalus	20 20 15 8
0.9 IAA 6.0 BA	Batang Daun Pucuk Petiol	Kalus Kalus Kalus Kalus	20 15 18 10
1.5 IAA 6.0 BA	Batang Daun Pucuk Petiol	Pucuk berganda Pucuk berganda Kalus Kalus	35 40 40 50

Plat 4 : Proses pemindahan plantlet lengkap *C.annuum* ke tanah.

- 4a : Regenerasi tumbuhan lengkap yang berusia 3 minggu disubkultur ke dalam media MS yang mengandungi 1.0 mg/l IAA dan 4.0 mg/l BA.
- 4b : Selepas 6 minggu anak pokok didedahkan kepada persekitaran biasa (suhu bilik) secara beransur-ansur.
- 4c : Anak pokok dipindahkan ke kebun di bawah keadaan teduh.
- 4d : Regenerasi tumbuhan telah biasa dengan persekitaran *in vivo*

4a





4c



○ 4mm

4d



0 30 mm



Plat 5 : Plantlet *C. annuum* yang telah dipindahkan ke kebun mengeluarkan bunga selepas 3 bulan.

Penambahan 0.3 mg/l IAA ke dalam media MS boleh menginduksikan regenerasi dari eksplan petiol tetapi peratus pembentukannya hanya 30%, manakala eksplan batang hanya membentuk kalus putih kekuningan sebanyak 20%. Media MS yang mengandungi 0.5 mg/l IAA pula, menginduksikan akar ( kurang dari 10% ) dari semua eksplan yang digunakan ( pucuk, batang, petiol dan daun ).

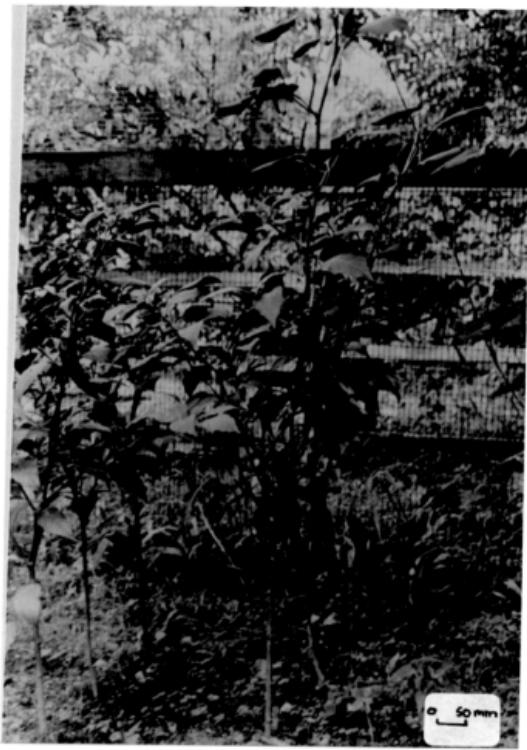
Penambahan 0.5 mg/l BA kepada media yang mengandungi 0.1 mg/l IAA tidak mengubah respons kesemua eksplan di mana semua eksplan hanya menghasilkan kalus seperti mana respons eksplan ke atas media yang hanya mempunyai 0.1 mg/l IAA sahaja. Peratus pembentukan kalus dari eksplan daun ialah 25%, eksplan batang 30% dan petiol menghasilkan 25% kalus putih kekuningan. Respons yang sama juga diperhatikan terhadap eksplan yang dikultur di atas media MS dengan 0.5 mg/l BA yang ditambah dengan 0.2 mg/l IAA.

Eksplan daun yang dikultur di atas media MS yang mengandungi 1.0 mg/l IAA bersama 4.0 mg/l BA boleh menginduksikan pucuk berganda sehingga 80%. Sungguhpun begitu, eksplan lain seperti eksplan batang, petiol dan pucuk tidak menunjukkan sebarang respons iaitu eksplan bertukar warna menjadi perang dan akhirnya mati. Apabila kandungan BA ditambah menjadi 5.0 mg/l dan 0.4 mg/l IAA, kesemua eksplan menginduksikan kalus. Keputusan yang berlainan diperolehi apabila eksplan dikultur di atas media yang mengandungi 5.0 mg/l BA dengan 0.5 mg/l IAA di mana eksplan daun dan batang menginduksikan pucuk berganda iaitu eksplan daun 25% dan eksplan batang 30%. Sekiranya kepekatan IAA ditambah menjadi 1.0 mg/l,

hanya eksplan batang sahaja yang menginduksikan pucuk berganda ( 20% ) tetapi eksplan petiol, daun dan pucuk hanya menghasilkan kalus. Apabila kepekatan IAA ditambah lagi menjadi 1.5 mg/l IAA, kesemua eksplan hanya mampu menginduksikan kalus.

Media MS yang ditambah dengan 5.0 mg/l BA bersama-sama 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 1.0 dan 1.5 mg/l IAA hanya menginduksikan kalus dari eksplan batang, daun, pucuk dan petiol. Walaupun begitu, apabila eksplan batang dikultur di atas media MS yang mengandungi 6.0 mg/l BA bersama dengan 1.0 mg/l IAA pucuk berganda dihasilkan iaitu 20% dan apabila kepekatan IAA ditambah menjadi 1.5 mg/l eksplan daun juga menginduksikan pucuk berganda (40%) disamping 35% pucuk berganda diperolehi dari eksplan batang.

Berdasarkan kepada keputusan-keputusan yang diperolehi, didapati bahawa media MS yang ditambah dengan hormon IAA sahaja dan kombinasi hormon IAA dan BA menunjukkan respons untuk menghasilkan regenerasi bagi kedua-dua var. MC 4 dan MC 5.



Plat 6 : *C.annuum* dari sistem *in vitro* menghasilkan buah selepas 4 bulan dipindahkan ke kebun.

#### **5.4 RINGKASAN KEPUTUSAN**

1. Tiada regenerasi *C. annuum* var. MC 4 dan MC 5 dihasilkan dari media MS yang ditambah dengan 0.2 mg/l NAA. Walau bagaimanapun terdapat pembentukan kalus. Kombinasi hormon NAA dan BA pula menunjukkan tiada respons kepada spesies *C. annuum* var. MC 4 dan MC 5 ini.
2. Media MS yang ditambah dengan 0.2 mg/l IAA merupakan media paling optima untuk menghasilkan regenerasi langsung dari eksplan petiol, batang dan pucuk.
3. Kombinasi IAA dan BA pada kepekatan rendah menginduksikan kalus dan akar bagi *C. annuum* var. MC 4 dan MC 5.
4. Regenerasi tumbuhan lengkap *C. annuum* diperolehi melalui pembentukan pucuk berganda menggunakan media MS dengan kombinasi IAA dan BA iaitu 1.0 mg/l IAA + 4.0 mg/l BA; 0.5 mg/l IAA + 5.0 mg/l BA ; 1.0 mg/l IAA + 5.0 mg/l BA; 1.0 mg/l IAA + 6.0 mg/l BA dan 1.5 mg/l IAA + 6.0 mg/l BA.
5. Eksplan batang merupakan eksplan yang paling responsif untuk regenerasi berbanding dengan eksplan daun, pucuk dan petiol berdasarkan kepada keupayaannya menghasilkan regenerasi tumbuhan melalui pembentukan plantlet (80%) dan pucuk berganda (30-35%).