

BAB 7: PERBINCANGAN

Carnation digelar oleh Shakespeare sebagai bunga yang paling cantik sepanjang musim. Carnation juga merupakan bunga keratan rentas yang ketiga popular di Malaysia selepas ros dan kekwa (Jamil *et al.*, 1990). Dalam kajian ini, carnation dipropagasikan dengan pesat menggunakan kaedah kultur tisu dan kelakuan sel akar tumbuhan yang ditanam secara *in vitro* dibandingkan dengan sel-sel akar tumbuhan 'intact' nya.

Pada permulaan eksperimen, biji benih *Dianthus caryophyllus* Linn. cv. Grenadin dicambahkan di atas kapas lembap yang disteril pada suhu $25 \pm 1^\circ \text{C}$ dan diberi 16 jam cahaya dan 8 jam gelap selama 5 hari. Eksperimen ini bertujuan untuk menentukan panjang serta umur akar anak cambah yang optima untuk kegunaan kajian sitologi ke atas sel-sel akar carnation ini. Eksperimen dijalankan pada keadaan aseptik untuk meminimakan perbezaan yang wujud di antara anak-anak cambah tersebut apabila dilakukan pengkulturan dalam sistem *in vitro*.

Daripada eksperimen awal ini, didapati anak cambah carnation yang berusia 4 hari dan mempunyai purata panjang akar 11.15 ± 0.33 mm merupakan peringkat yang paling sesuai bagi kajian sitologi sel-sel akar primer tumbuhan ini. Purata kadar pemanjangan akar adalah 2.96 mm/hari. Kadar pemanjangan akar yang diperolehi daripada anak cambah yang aseptik ini mungkin menjadi penunjuk yang tepat bagi memilih akar-akar yang sesuai untuk digunakan dalam kerja-kerja yang melibatkan pengkulturan tisu tumbuhan.

Biji benih carnation yang bercambah di atas kapas lembap telah tumbuh dengan kadar yang agak pantas dan peratus percambahannya juga adalah tinggi, iaitu 94%. Biji benih mula bercambah sehingga 72% pada hari pertama selepas semaian. Biji benih carnation mempunyai testa yang tidak terlalu tebal, jadi ia tidak memerlukan teknik perendaman semalaman dan skarifikasi. Perlakuan skarifikasi ke atas biji benih yang bertesta keras kadang kala menyebabkan kecederaan mekanikal apabila biji benih ini diperlakukan dengan asid pekat seperti asid sulfurik (H_2SO_4) dan asid hidroklorik (HCl). Bagaimanapun skarifikasi dibuktikan boleh menambah kadar percambahan biji benih tumbuhan bertesta keras seperti *Psophocarpus tetragonolobus* (Abu Shah, 1996).

Semasa percambahan biji benih, pada awalnya tumbuhan mula menyerap air dan mengakhiri fasa dormannya. Perubahan-perubahan metabolit akan berlaku. Polisakarida seperti kanji yang tersimpan di dalam kotiledon digunakan semasa percambahan. Apabila biji benih mula menyerap air, hormon asid giberelik akan menginduksikan sintesis α -amilase dan lain-lain enzim hidrolitik. α -amilase ini berperanan dalam menghidrolisiskan rantaian polisakarida seperti kanji kepada monomer monosakarida yang lebih kecil. Disamping itu, lipase akan menukarkan rantaian lemak kepada asid lemak dan gliserol, protease menghidrolisiskan protein kepada asid-asid amino bersama triptofan yang amat diperlukan untuk sintesis IAA bagi menginduksikan pemanjangan akar. Hormon sitokinin pula terdapat di dalam embrio untuk menginduksikan perkembangan pucuk.

Dalam masa satu hari, percambahan bermula dengan kemunculan radikel, diikuti dengan koleoptil. Biji benih carnation menunjukkan percambahan jenis epigeal. Pada hari ke lima, akar sekunder mula muncul. Kemunculan akar sekunder ini mewujudkan persaingan dari segi pengambilan nutrien dengan akar primer. Akar adalah heterotrofik dan bergantung kepada sumber karbohidrat, beberapa jenis vitamin dan hormon yang diangkut ke akar oleh pucuk-pucuk yang berfotosintesis. Oleh kerana itu, kehadiran akar sekunder dihindarkan dalam kajian ini dan kajian ini hanya tertumpu kepada akar primer sahaja.

Kadar pemanjangan akar primer carnation adalah 2.96 mm/hari yang diperolehi daripada graf garis lurus tumbesaran akar piawai (Graf 1, m.s. 49). Kadar tumbesaran ini diperolehi pada suhu kajian 25 ± 1 °C kerana berdasarkan kajian terdahulu oleh Hew dan Lee (1982) ke atas *Psophocarpus tetragonolobus* menunjukkan bahawa suhu yang tinggi seperti 35 °C menyebabkan kadar tumbesaran akar berkurangan berbanding pada suhu 25 °C.

Berdasarkan kajian awal ini, panjang akar primer piawai adalah 11.15 ± 0.33 mm yang diperolehi daripada anak cambah berusia 4 hari. Akar primer carnation yang memenuhi panjang piawai ini sahaja yang digunakan untuk kajian sitologi seterusnya. Dengan membuat pemilihan ini variasi di antara sel-sel akar yang memasuki fasa S dan mitosis dapat dikurangkan (Jakob dan Bovey, 1969). Bryant (1969) menunjukkan wujudnya korelasi di antara panjang akar dengan indeks mitosis (MI). Ini mencadangkan bahawa panjang akar yang digunakan mestilah yang menunjukkan populasi sel-sel yang seragam agar dapat merendahkan kadar

aberasi MI. Tambahan pula, keseragaman sampel akar akan menambahkan 'synchronous' populasi sel dari fasa G1 ke fasa mitosis (Thomas dan Davidson, 1981). Oleh kerana itu, akar primer yang mempunyai panjang piawai di antara (10.82 - 11.48) mm sahaja yang dipilih untuk kajian sitologi seperti kajian penentuan nilai indeks mitosis (MI), bilangan kromosom, kandungan DNA nukleus, luas sel dan luas nukleus serta penentuan masa penggandaan sel dari sistem *in vivo* dan *in vitro*.

Purata nilai indeks mitosis (MI) yang direkodkan bagi carnation adalah agak tinggi iaitu $43.51 \pm 2.14\%$ (m.s. 68) berbanding *Petunia hybrida* (11.63 ± 0.26) % (Abdullah, 1998) dan *Vicia faba* ($13.82\% \pm 2.41\%$) (Taha, 1989). Di bawah keadaan yang hampir sama iaitu pada suhu 20-22° C serta 16 jam cahaya dan 8 jam gelap, nilai MI bagi *Pisum sativum* ialah $6.47\% \pm 1.49\%$, *Zea mays* pula $9.52 \pm 1.05\%$ dan *Allium cepa* $6.38 \pm 2.18\%$ (Mozaffari dan Gahan, 1978). Nilai-nilai MI ini didapati jauh lebih rendah berbanding carnation.

Nilai MI ditentukan daripada segmen akar primer yang mempunyai panjang di antara 0-2mm. Segmen ini merupakan kawasan yang paling aktif membahagi dan secara amnya nilai MI bertambah dengan jarak daripada apeks akar. Kawasan hujung akar yang melebihi 5mm daripada hujung akar mempunyai hanya sedikit sahaja sel-sel yang sedang membahagi dan kebanyakan selnya telah memasuki fasa pembezaan (Woodard *et al.*, 1961).

Purata bilangan kromosom yang diperolehi daripada sel-sel akar primer yang ditanam secara *in vivo* adalah 29.75 ± 0.12 dengan julat kromosom di antara 29-30 (m.s. 65). Didapati purata bilangan kromosom yang ditentukan adalah menghampiri 30 iaitu menyamai nilai bilangan kromosom diploid bagi *Dianthus caryophyllus* ($2n=2x=30$) yang dilaporkan oleh Carolin (1957). Tiada variasi bilangan kromosom yang diperhatikan dalam sel-sel akar primer carnation yang ditanam secara *in vivo*.

Purata luas sel akar carnation yang ditanam secara *in vivo* adalah $142.90 \pm 0.59 \mu\text{m}^2$ dan purata luas nukleusnya ialah $26.59 \pm 0.09 \mu\text{m}^2$ (m.s. 70). Perubahan luas nukleus didapati berkadar terus dengan perubahan luas selnya. Perbandingan tidak dapat dibuat dengan kajian daripada penyelidik lain kerana kesukaran untuk mendapatkan rujukan berkenaan luas sel dan nukleus carnation yang menggunakan kaedah yang sama.

Taburan kandungan DNA nukleus di dalam sel akar primer carnation yang berusia 4 hari dan ditanam secara *in vivo* menunjukkan 94.74% selnya mempunyai lebih daripada $4.8C$ (poliploid) (m.s. 70). Tiada sel berada pada G_1 , 1.32% pada fasa S dan 3.95% pada fasa sintesis (G_2). Didapati taburan DNA nukleus carnation adalah di antara $3.4C$ - $13.0C$. Kehadiran poliploid yang tinggi ini adalah menghairankan kerana selalunya hanya tisu akar yang matang dan dalam peringkat untuk memasuki fasa pembezaan sahaja yang biasa menunjukkan poliploid yang tinggi (Nagl, 1978) sedangkan tisu akar carnation diambil pada kawasan meristematiknya iaitu pada segmen 0-2mm daripada hujung akarnya.

Kehadiran sel poliploid yang tinggi pada carnation yang ditanam secara *in vivo* ini juga berbeza berbanding beberapa spesies lain seperti *Petunia hybrida* (Abdullah, 1998) dan *Psophocarpus tetragonolobus* (Abu Shah, 1996) di mana tiada sel poliploid yang didapati pada sel-sel akar tumbuhan *in vivo*nya.

Masa yang diambil oleh sel-sel akar primer *Dianthus caryophyllus* cv. Grenadin yang ditanam secara *in vivo* untuk melengkapkan satu kitaran atau mengandakan bilangan sel-selnya adalah selama 66.11 jam. Ini memberikan gambaran bahawa satu sel anak memerlukan masa lebih daripada dua hari untuk melakukan proses-proses seperti sintesis sitoplasma dan organel-organel, pengembangan isipadu nukleus atau saiz sel, memasuki fasa mitosis dan pembahagian untuk membentuk sel-sel baru. Menurut Clowes dan Juniper (1968) meristem apikal akar tumbuhan peringkat tinggi mempunyai purata kadar pembahagian sekali dalam sehari. Kenyataan ini tidak sesuai digunakan untuk tumbuhan carnation cv. Grenadin. Tempoh penggandaan sel (Cdt) amat bergantung kepada panjang hujung akar yang terlibat dan juga suhu. Evans dan Savages (1959) memperolehi Cdt *Vicia faba* adalah 2 jam pada suhu 19° C dan 23 jam pada suhu 25° C. Heynowicz (1959) pula memperolehi Cdt yang berbeza bagi *Triticum* yang ditanam pada suhu 18° C berdasarkan jaraknya daripada hujung akar. Pada jarak 0.15mm daripada hujung akar, Cdt *Triticum* adalah 21 jam dan nilainya bertambah kepada 60 jam pada 0.9mm daripada hujung akar.

Aktiviti sel dalam akar dari sistem *in vivo* merupakan satu data rujukan asas untuk memudahkan perbandingan dibuat dengan aktiviti sel-sel dalam keadaan *in vitro*.

Pengamatan kelakuan sel pada kedua-dua keadaan adalah penting untuk mengesan kehadiran tanda-tanda awal variasi somaklon di mana jika variasi ini berlaku di dalam nukleus dan komposisi akar di dalam sistem kultur tisu, variasi somaklon boleh terjadi. Sebaliknya, jika komposisi sel di dalam sistem kultur tisu adalah stabil, peluang untuk regeneran-regeneran mempunyai status sel yang sama seperti induk adalah tinggi. Oleh sebab itu, adalah penting untuk mendapatkan sistem yang baik bagi regenerasi spesies ini melalui penentuan media serta persekitaran fizikal yang sesuai. Jadi perlakuan sel meristem akar pada kedua-dua keadaan dapat dibuat perbandingan.

Objektif utama kajian awal mengenai kultur tisu *Dianthus caryophyllus* adalah untuk mengkaji aspek-aspek berkaitan morfogenesis dan organogenesis daripada organ atau tisu kalus yang tidak mengalami perbezaan. Pertumbuhan sel-sel dan tisu-tisu carnation *in vitro* didapati amat bergantung kepada penambahan bahan penggalak tumbesaran tertentu kepada media. Respons yang ditunjukkan oleh eksplan merupakan satu adaptasi terhadap pemindahan sel-sel daripada keadaan *in vivo* kepada keadaan *in vitro*. Oleh sebab itu, sepanjang kajian dijalankan pelbagai respons telah diperhatikan seperti kalus yang terdiri daripada pelbagai warna, akar, pucuk berganda dan lain-lain bergantung kepada kombinasi hormon yang digunakan.

Media tanpa hormon digunakan sebagai kawalan untuk menginduksikan regenerasi kerana ada sesetengah spesies masih boleh diregenerasikan walaupun tanpa hormon diberikan. Dalam kajian ini eksplan batang bermod dan pucuk yang

diletakkan di atas media MS tanpa hormon didapati boleh menghasilkan pucuk berganda dan akar. Eksplan yang telah digunakan semasa percubaan untuk mendapatkan regenerasi carnation cv. Grenadin ini adalah akar, batang, daun, pucuk dan batang bernod.

Eksplan yang berbeza menunjukkan respons yang berlainan di dalam sistem kultur tisu. (Jadual 14 m.s. 125). Apabila eksplan dikultur di atas MS tanpa hormon selama 4 minggu, regenerasi tumbuhan lengkap cuma didapati daripada eksplan batang bernod dan pucuk dengan bilangan 1-3 pucuk berganda sahaja. Bagi eksplan lainnya, regenerasi pucuk berganda gagal didapati.

Eksplan-eksplan yang dikultur di atas media yang ditambah dengan 0.5-2mg/l NAA didapati membentuk kalus dan akar pada peratus yang tinggi. Pemerhatian ini turut disokong oleh Kovac, (1992) dan Kozai *et al.*, (1988) yang menjalankan kajian kultur tisu ke atas carnation daripada kultivar yang sama. Cuma eksplan batang bernod dan pucuk sahaja yang mampu menghasilkan pucuk berganda di atas media MS yang ditambah dengan NAA dengan bilangan 1-12 pucuk berganda per eksplan. NAA merupakan auksin sintetik yang didapati memberikan respons yang baik untuk menghasilkan akar. Bagi eksplan yang dikultur di atas media MS yang ditambah dengan BA sahaja, didapati eksplan daun cuma membentuk kalus dan regenerasi pucuk berganda berlaku pada eksplan batang, batang bernod dan pucuk. Eksplan batang bernod didapati sangat responsif di atas media yang ditambah dengan BAP dan mampu membentuk 4-24 pucuk berganda di atas media yang ditambah dengan 0.5-2.0 mg/l BAP. Penemuan ini

menyokong penemuan yang menyatakan bahawa BAP diperlukan untuk menginduksikan pembentukan pucuk dalam sistem kultur tisu. Walaupun berjaya menghasilkan pucuk berganda namun bagi eksplan daun, batang dan akar penggunaan hormon BAP secara bersendirian selepas 45 hari didapati menyebabkan hampir semua tisu-tisunya menjadi nekrotik (Jadual 14, m.s. 125).

Apabila pelbagai kombinasi kepekatan hormon NAA dan BAP digunakan ke atas semua eksplan yang dikaji, pelbagai respons telah diperhatikan. Eksplan daun contohnya berjaya menghasilkan pucuk berganda tetapi pada peratus dan bilangan pucuk berganda yang rendah (2-4 pucuk per eksplan). Penemuan ini juga didapati oleh beberapa penyelidik lain seperti Sankhla *et al.*, (1995) dengan menggunakan eksplan daun carnation cv. 'German Red' yang diletakkan di atas media MS yang ditambah dengan 2 μ M NAA dan pelbagai kombinasi BAP. Eksplan akar pula didapati cuma membentuk kalus sahaja. Eksplan batang berjaya menghasilkan sehingga 15 pucuk berganda per eksplan di atas media MS yang ditambah dengan 0.5 mg/l NAA dan 1.5 mg/l BAP. Eksplan pucuk dan batang bermod adalah eksplan yang paling responsif. Pada kombinasi kepekatan hormon NAA yang lebih rendah daripada BAP, 100% eksplan didapati mampu meregenerasikan pucuk berganda sehingga 28 pucuk per eksplan. Eksplan batang bermod dan pucuk berjaya menghasilkan bilangan pucuk berganda yang paling banyak di atas media 0.5 mg/l NAA dan 1.5 mg/l BAP. Penemuan ini menyamai keputusan kajian ke atas *Dianthus arenarius* (Kovac, 1995) yang mendapati bahawa kesan kepekatan sitokinin yang tinggi berbanding kepekatan auksin (2.25 mg / l IBA dan 0.1 mg/l IAA) berjaya menghasilkan pucuk berganda dengan bilangan yang paling tinggi.

Kesan ini biasa bagi kebanyakan tumbuhan kultur tisu (Pierik, 1987). Akar selalunya tidak terbentuk dan pucuk-pucuk berganda tumbuh dalam bentuk berkelompok (Plat 7 m.s. 135).

Pucuk berganda tanpa akar yang didapati daripada kultur di atas media berhormon kemudiannya disubkulturkan di atas media tanpa hormon untuk menginduksikan akar kerana media tanpa hormon didapati berjaya membentuk akar dengan lebih cepat berbanding di atas media berhormon NAA dan IAA (lihat m.s. 134). Penemuan ini berbeza daripada pendapat Roest dan Bokelman (1981) yang mendapati bahawa media untuk pertumbuhan akar yang sesuai untuk pucuk yang dihasilkan daripada eksplan pucuk dan batang bernod carnation ialah MS yang ditambah dengan 0.1mg/l IAA. Petru *et al.*, (1971) pula mendapati media untuk pertumbuhan akar yang sesuai untuk plantlet yang terbentuk daripada eksplan pucuk carnation cv. Grenadin adalah 0.4mg/l NAA dalam media Morel.

Kajian terhadap *Licopersicum esculentum* (Branca *et al.*, 1991) menunjukkan bahawa sebarang eksplan yang dikultur di dalam media yang mengandungi auksin akan mengeluarkan akar. Ini juga berlaku pada eksplan *Dianthus caryophyllus* cv. Grenadin. Penyelidik terdahulu seperti Bouilenne dan Went (1993) berpendapat bahawa kehadiran satu faktor rizogenetik tertentu yang dipercayai adalah auksin telah menyebabkan pengeluaran akar. Auksin bertindak bersama tiga faktor lain iaitu suhu, cahaya dan kandungan sukrosa.

Kombinasi faktor hormon, nutrien dan persekitaran fizikal yang sesuai telah membolehkan bahagian-bahagian vegetatif tumbuhan seperti daun, batang dan akar mengalami proses pembahagian semula dan membentuk organ-organ baru. Mekanisme yang terlibat di dalam proses pembahagian semula ini berkemungkinan adalah hasil daripada perbezaan semula elemen-elemen parenkima dalam tisu eksplan kepada sel-sel jenis kambium dan membahagi dalam arah-arrah tertentu diikuti oleh beberapa proses lanjutan kepada keadaan meristematik. Kajian awal menunjukkan pembezaan semula sel-sel parenkima dalam sistem *in vitro* adalah secara spontan (Gautheret, 1942) atau melalui tindakan bahan-bahan penggalak tumbesaran (Buvat, 1994, 1945). Kajian selanjutnya lebih menyokong bahawa pembezaan semula tisu eksplan berlaku akibat penambahan bahan-bahan penggalak tumbesaran ke dalam media yang digunakan. Kombinasi auksin-sitokinin telah didapati memberi kesan terhadap pertumbuhan baru sel-sel tumbuhan. Auksin dan sitokinin merupakan bahan penggalak tumbesaran yang terlibat dalam pembahagian sel. Toren (1955) pula mendapati bahawa faktor yang menyebabkan pembezaan semula tidak hanya diakibatkan oleh faktor bahan penggalak tumbesaran sahaja tetapi juga oleh nutrisi tisu-tisu terutamanya bahan-bahan organik. Bagi tisu lobak merah misalnya, ia memerlukan nitrogen, fosforus dan kalium untuk membentuk zon kambium.

Pengamatan histologi menunjukkan bahawa primordia pucuk adalah sama seperti meristem akar yang muncul daripada tengah tisu-tisu yang telah mengalami pembezaan semula (Gautheret, 1942; Buvat 1944; 1945). Setiap primordia muncul akibat proses pembezaan semula dan proses penyusunan kumpulan-kumpulan sel.

Proses yang terlibat ini berlaku dalam semua eksplan yang dikultur di dalam media yang mengandungi bahan penggalak tumbesaran yang sesuai.

Terdapat kajian yang menyatakan bahawa dengan meletakkan tisu-tisu *in vivo* kepada persekitaran *in vitro* akan mengubah konstitusi genetik tisu-tisu tersebut (Swartz, 1991). Kajian ke atas carnation cv. Grenadin ini turut meliputi kajian sitologi untuk memerhatikan dengan lebih terperinci sebarang perubahan yang berlaku di peringkat selular sel-sel carnation ini. Penentuan aktiviti sel carnation dari sistem *in vitro* meliputi penentuan nilai purata indeks mitosis (MI), bilangan kromosom, purata luas sel dan nukleus, taburan DNA nukleus dan penentuan masa penggandaan sel.

Secara amnya, nilai purata indeks mitosis bagi sel-sel akar carnation *in vitro* yang tertinggi adalah 43.77% iaitu selepas 3 minggu dikultur. Nilai ini tidak berbeza dengan signifikan ($p > 0.05$) dengan nilai MI sel carnation yang ditanam *secara in vivo* (43.5%). Nilai MI yang tinggi ini menunjukkan keaktifan sel-sel membahagi dan mempunyai potensi regenerasi yang tinggi. Tumbuhan dalam sistem *in vitro* yang mempunyai nilai MI sel-sel akar yang lebih rendah daripada sel-sel dalam keadaan *in vivo* menunjukkan kebolehan spesies tumbuhan tersebut untuk meregenerasikan pucuk-pucuk baru turut berkurangan. Contohnya, bagi *Psophocarpus tetragonolopus* (Abu Shah dan Taha, 1994), nilai MI sel-sel akar dari sistem *in vitro* didapati lebih rendah (3.88%) berbanding sel-sel *in vivo*nya (4.37%). Kerana itu, amat sukar untuk mendapatkan regenerasi daripada eksplan tumbuhan tersebut.

Apabila eksplan dipindahkan daripada keadaan *in vivo* kepada keadaan *in vitro*, didapati nilai MI berkurangan dan berbeza dengan bererti ($p < 0.05$) selepas 4 hari dipindahkan. Pada keadaan *in vivo*, purata nilai MI sel akar primer carnation adalah 43.51% dan berkurangan sehingga 32.32% pada hari ke 4 di dalam kultur *in vitro*. Penurunan nilai MI pada empat hari pertama di dalam kultur *in vitro* mungkin disebabkan oleh perubahan persekitaran yang menyebabkan proses pembahagian sel mengalami sedikit gangguan dan kejutan persekitaran. Tambahan pula, bahagian yang terpotong menyentuh media MS yang mengandungi auksin, NAA. Auksin memang telah dikenali sebagai hormon yang membantu dalam pembahagian dan pemanjangan sel (Wareing dan Philips, 1981). Das *et al.*, (1958) telah mendapati bahawa nilai MI sel-sel empulur batang *Nicotiana* yang mengandungi sel-sel parenkima bertambah selepas 6 hari dikultur di dalam media yang dibekalkan dengan 2mg/l IAA dan 0.5mg/l Kinetin. Di dalam kajian ini, nilai MI carnation cv. Grenadin juga didapati meningkat selepas 6 hari di kultur di atas media MS yang bertambah dengan 2.0mg/l NAA di mana pada hari ke 7, nilai MI meningkat dengan signifikan ($p < 0.05$) sehingga mencapai nilai tertinggi iaitu 43.77% pada minggu ke-3 selepas dikultur. Namun begitu, selepas 3 minggu, nilai MI didapati menurun semula sehingga mencapai 33.17% iaitu selepas 6 bulan dikultur.

Purata bilangan kromosom *Dianthus caryophyllus* Linn. Cv. Grenadin yang ditanam secara *in vivo* ialah 29.7; satu nilai yang menghampiri nilai 30. Carolin (1957) mendapati bahawa bilangan kromosom carnation adalah $2n=30$. Bilangan kromosom yang ditunjukkan oleh carnation dari sistem kultur tisu juga

menunjukkan nilai yang menghampiri kromosom diploid; $2n=30$. Meristem akar carnation mempamerkan kestabilan bilangan kromosom walaupun dikultur sehingga 6 bulan. Pada hari pertama dikultur, bilangan kromosom adalah 29.4, 28.9 (hari 2), 29.7 (hari 3), 29.0 (hari 4), 29.5 (minggu 1), 29.9 (minggu 2), 29.9 (minggu 3), 29.5 (minggu 4), 28.8 (minggu 5), 28.7 (minggu 6), 28.7 (minggu 7), 28.0 (minggu 8), 28.3 (bulan 2), 28.3 (bulan 3) dan 29 (bulan 6). Walaupun bilangan kromosom carnation adalah stabil sepanjang 6 bulan dikultur, sel-sel akar didapati tidak mampu untuk meregenerasikan pucuk berganda. Torrey (1967) telah mencadangkan bahawa kehilangan kemampuan untuk membentuk organ seperti pucuk mungkin mempunyai kaitan dengan paras ploidi yang tinggi di dalam tisu atau dengan bertambahnya darjah aneuploidi. Jika dirujuk kepada bilangan kromosom, didapati kultur adalah dalam keadaan diploid dan dijangka mampu untuk meregenerasikan pucuk baru. Bagaimanapun, apabila kandungan DNA nukleus diukur, didapati tahap ploidi sel-sel interfasa adalah sangat tinggi di sepanjang tempoh kultur. Maka berdasarkan pendapat Torrey (1967) di atas, tahap ploidi yang tinggi bermakna sel akar tidak mampu untuk meregenerasi membentuk pucuk baru. Dalam kajian ini, rizogenesis didapati berlaku tetapi regenerasi pucuk berganda tidak berlaku. Selalunya pada tahap ploidi yang tinggi, koordinasi pembahagian sel tidak dapat berlaku dengan baik dan tidak dapat menghasilkan struktur organ dengan baik. Dengan itu, tiada regenerasi pucuk boleh didapati.

Bagi carnation yang dikultur di atas media MS yang ditambah dengan 2.0mg/l NAA, peratus sel poliploid dengan kandungan DNA nukleus $>4.8C$ adalah tinggi

iaitu di antara 42.67-100%. Memandangkan sel carnation yang ditanam *secara in vivo* mempunyai tahap ploidi yang tinggi (sehingga 94.7%), didapati selepas 1 hari dikultur, 100% sel adalah poliploid. Peratus poliploid menurun semula pada hari ke 2 kepada 61.64% sehingga 67.53% pada minggu ke 3 selepas dikultur. Peratus sel-sel poliploid meningkat semula apabila semakin lama dikultur, contohnya selepas 4 bulan dikultur 93.92% selnya adalah poliploid. Turun naik paras ploidi ini mungkin memberi kesan dan mempengaruhi keupayaan sel atau tisu untuk meregenerasi. Ada kemungkinan pada hari kedua sehingga 3 minggu di dalam kultur, penurunan tahap ploidi daripada 100% kepada 67.53% membenarkan rizogenesis berlaku dengan pesat. Peningkatan semula tahap ploidi pada minggu ke 4 sehingga 6 bulan dikultur pula mungkin menyebabkan kegagalan pembentukan regenerasi pucuk berlaku. Menurut Skirvin (1978), perubahan selular biasa didapati dalam sistem kultur tisu dan pertambahan paras ploidi menjadi petunjuk kepada tahap kestabilan sel di dalam kultur. Pertambahan tahap ploidi juga mungkin menyebabkan kekurangan potensi regenerasi dalam spesies-spesies tertentu.

Kehadiran sel-sel poliploid di dalam tisu yang dikultur mungkin disebabkan oleh keadaan persekitaran sistem *in vitro* yang menggalakkan proses endoreduplikasi berlaku dalam populasi selnya. Menurut D' Amato (1977b), selain daripada endoreduplikasi yang mungkin telah berlaku semenjak dalam keadaan *in vivo* lagi, poliploid *in vitro* juga mungkin disebabkan oleh faktor lain seperti pembentukan restitusi nukleus atau pembelahan gelendung dalam sel-sel binukleat atau multinukleat. Dalam kajian ini, pembentukan sel binukleat dan multinukleat tidak

diperhatikan, jadi poliploid mungkin disebabkan oleh restitusi nukleus yang disebabkan oleh kegagalan gelendung dan pemberhentian kromosom pada peringkat anafasa (Bayliss, 1973). Bagaimanapun keadaan ini masih tidak dapat disahkan kerana tiada aberasi kromosom yang diperhatikan dalam kajian ini.

Keadaan persekitaran *in vitro* mungkin turut menjadi faktor berlakunya poliploidi terutamanya faktor hormon eksogenus seperti auksin dan sitokinin serta suhu (Binns dan Meins, 1980). Dalam kajian ini, segmen akar dikultur di atas media MS yang ditambah dengan 2.0mg/l NAA yang mungkin menyebabkan poliploidi berlaku di dalam populasi sel kultur. Binns dan Meins (1980) turut mendapati bahawa sel-sel yang diasingkan daripada tisu yang diinkubasikan selama 21 hari pada suhu 35° C di atas media MS asas kekal diploid, sebaliknya pada suhu 25° C, banyak sel-sel didapati membentuk poliploid.

Kandungan DNA nukleus mungkin turut berkaitan dengan isipadu nukleus kerana dijangkakan saiz nukleus akan bertambah apabila kandungan DNA digandakan. Sebaik sahaja berlakunya pembahagian sel (fasa G1), saiz nukleus menjadi lebih kecil. Pada peringkat ini, sel-sel mengandungi kandungan DNA nukleus sebanyak 2C. Seterusnya, nukleus menjalani replikasi, kandungan DNA nukleusnya menjadi 4C dan saiz nukleusnya berganda semula sebelum pembahagian sel yang berikutnya berulang semula.

Dalam kajian ini, purata luas sel profasa didapati meningkat dengan signifikan ($p < 0.05$) daripada $142.9 \pm 0.59 \mu\text{m}^2$ bagi sel akar primer yang ditanam secara *in*

vivo kepada $165.2 \pm 0.58 \mu\text{m}^2$ selepas sehari dikultur. Nilai luas sel didapati berubah turun naik sepanjang 6 bulan dikultur dengan nilai luas sel terkecil adalah $83.27 \pm 0.31 \mu\text{m}^2$ iaitu selepas 3 minggu dikultur dan luas sel terbesar pula adalah $181 \pm 0.49 \mu\text{m}^2$ iaitu selepas 1 minggu dikultur. Kemungkinan pada minggu ke 3, sel-selnya membahagi dengan lebih aktif untuk pembentukan akar kerana sel dan nukleus yang sedang membahagi selalunya kecil. Luas nukleus sel carnation didapati berkadar terus dengan luas selnya. Penemuan ini menyamai pemerhatian yang didapati oleh Cavalier-Smith (1982) tetapi berbeza dengan kajian Thomas dan Davidson (1983) ke atas *Vicia faba* di mana mereka mencadangkan bahawa hubungan di antara saiz sel dan nukleus boleh berubah-ubah tanpa mempengaruhi aktiviti mitosisnya dan saiz nukleus akan kekal konstan walaupun saiz selnya berkurangan. Jordan *et al.*, (1987) dan Cavalier-Smith turut memerhatikan terdapatnya korelasi di antara luas sel dan nukleus dan parameter-parameter ini pula dikawal oleh kuantiti DNA. Kajian ke atas carnation mendapati bahawa tiada korelasi yang jelas di antara kandungan DNA dengan luas sel dan nukleusnya kerana nilai luas sel dan nukleus kelihatan berubah-ubah sepanjang 6 bulan di dalam kultur *in vitro*.

Masa yang diambil untuk sesuatu sel menggandakan populasinya (Cdt) adalah berkaitan dengan keadaan sesuatu populasi sel tersebut. Sesuatu populasi sel yang berada pada fasa mitosis akan menunjukkan tempoh Cdt yang rendah iaitu bermaksud populasi sel tersebut aktif membahagi dan tidak atau kurang berhenti pada fasa G1. Masa penggandaan sel boleh digunakan sebagai suatu anggaran kasar bagi menentukan jangka masa edaran sel. Bayliss (1975) membuktikan

bahawa tempoh edaran sel bagi kultur diploid *Daucus carota* adalah 51.2 jam dan purata Cdt spesies ini pula adalah 50.9 jam. Tempoh edaran sel ini didapati telah dipengaruhi oleh fasa G1. Tempoh edaran sel akan menjadi lebih pendek jika fasa G1 adalah lebih singkat. Bayliss (1977a) sekali lagi menjumpai bahawa fasa G2 turut terlibat sekiranya tempoh edaran sel bertambah.

Di dalam kajian ini, sel-sel meristem akar yang berusia 3 minggu dari sistem *in vitro* didapati memerlukan 96 jam untuk menggandakan populasi tetapi Cdt sel-sel meristem akar dari sistem *in vivo* cuma memerlukan 66 jam sahaja. Cdt meristem akar dari sistem *in vitro* didapati lebih panjang walaupun hanya sedikit sel-selnya berada pada fasa G1 (0-1.3%). Ini mungkin disebabkan terdapatnya sel-sel yang berehat pada fasa G2 dengan peratus yang agak tinggi (0-43%) berbanding sel-sel akar meristem akar *in vivo* yang menunjukkan tiada sel yang berada pada fasa G1 dan cuma 3.9% berada pada fasa G2. Pengumpulan sel-sel pada fasa G2 inilah yang mungkin menjadi penyebab Cdt bagi akar yang ditanam secara *in vitro* ini menjadi lebih panjang daripada Cdt akar *in vivo*.

Pada umumnya tumbuhan yang diregenerasikan melalui sistem *in vitro* selalunya mempunyai keabnormalan kromosom (Bayliss, 1980). Ketidaknormalan ini pula dikaitkan dengan panjang tempoh pengkulturan dan bagi sesetengah kes, morfogenesis terus kehilangan potensinya (Torrey, 1967). Bagi carnation cv. Grenadin ini, tempoh kultur yang lama pada amnya didapati mengurangkan nilai indeks mitosis dan meningkatkan paras ploidinya yang mungkin mengurangkan potensi tumbuhan ini untuk meregenerasi.

Di dalam teknik kultur tisu, penggunaan eksplan yang terlibat terlebih dahulu dibuat pemotongan. Akibat pemotongan tisu eksplan ini, proses pembahagian sel akan terganggu. Tambahan pula, sel-sel di bahagian tepi potongan eksplan telah rosak lalu menyebabkan kebocoran nutrien dan bahan-bahan metabolit. Akibatnya, berlakulah autolisis dan pembebasan enzim-enzim hidrolitik seperti yang berlaku pada pemotongan tuber ubi kentang yang akhirnya menyebabkan ketidakstabilan genetik dalam sel-sel yang dikultur (Kahl, 1973).

Kajian ke atas carnation dikhususkan juga untuk membuat perbandingan dari segi kemampuan sumber-sumber eksplan yang berbeza untuk meregenerasikan pucuk baru pada tempoh kultur selama 3 bulan. Oleh kerana hormon tumbesaran terutamanya auksin dan sitokinin mempunyai pengaruh yang kuat terhadap perubahan konstitusi genetik sesuatu populasi sel, maka kajian ini telah menetapkan media untuk meregenerasi hanyalah satu sahaja iaitu media MS yang ditambah dengan 2.0mg/l NAA sahaja. Apabila kajian dilakukan ke atas status tisu regeneran, sel-sel dalam tisu tumbuhan tersebut sebolehnya mesti mempunyai tahap ploidi yang seragam. Jika eksperimen dimulakan dengan tisu yang mempunyai pelbagai tahap ploidi, tumbuhan yang diregenerasikan juga turut menghasilkan pelbagai tahap ploidi (Bansal dan Sen, 1985). Penentuan kandungan DNA nukleus sel-sel interfasa tumbuhan *in vivo* menunjukkan 94.7% sel mempunyai kandungan nukleus $>4.8C$ dan cuma 5.8% sahaja berada di antara 0-4.8C. Namun begitu, pemerhatian ke atas bilangan kromosom sel-sel akar

carnation yang ditanam secara in vivo mendapati bahawa sel-sel tersebut berada

di antara 4.8C dan 8.4C

Dalam kajian ke atas carnation ini, tisu-tisu daripada bahagian pucuk, batang bernod, daun, batang dan akar telah dipilih untuk memulakan kultur. Pemilihan tisu eksplan untuk memulakan propagasi boleh menjadi satu asas penting untuk melihat keupayaan meregenerasi. Kestabilan genetik tisu-tisu eksplan didapati lebih besar di dalam tisu-tisu muda yang baru berkembang (Demarly, 1986). Misalnya, eksplan dari daun ke dua dan ke tiga daripada hujung apeks carnation cv. 'German Red' didapati berupaya menghasilkan regenerasi yang lebih baik daripada daun yang lebih tua (Sankhla *et al.*, 1995). Secara amnya, bagi tumbuhan yang sama dipercayai kandungan nuklear juga adalah sama walaupun diambil dari mana-mana bahagian tumbuhan tersebut. Bagaimanapun, apabila eksplan yang berbeza diletakkan di bawah keadaan *in vitro*, beberapa perubahan telah dikesan.

Apabila eksplan batang, daun dan akar dikultur di atas media MS yang ditambah dengan 2.0mg/l NAA didapati ia cuma berjaya membentuk akar sahaja tanpa penghasilan pucuk baru. Tisu eksplan ini dinamakan tisu eksplan tidak regeneratif. Walaupun demikian, tisu yang tidak regeneratif ini menunjukkan peratus MI yang tinggi iaitu 43.3% bagi eksplan batang, 43.7% bagi eksplan akar dan 36.6% bagi sel daun.

Eksplan pucuk dan batang bernod yang berjaya menghasilkan pucuk berganda pula dinamakan tisu eksplan regeneratif. Tiada perbezaan yang bererti ($p > 0.05$) didapati dari segi MI tisu eksplan yang berjaya meregenerasikan pucuk berganda. Bagi eksplan pucuk, nilai MInya adalah 43.7% dan 39.8% bagi eksplan batang bernod. Nilai MI ini menjadi petunjuk kepada keaktifan sel-sel dan pengukur

kepada potensi regenerasinya. Tijan dan Taha (1994) mendapati bahawa sel-sel *Capsicum annum* mampu meregenerasi membentuk pucuk berganda dengan mempunyai nilai MI yang tinggi. Eksplan pucuk dan batang bermod carnation yang berjaya menghasilkan pucuk berganda juga menunjukkan cerapan yang serupa. Didapati juga semakin lama regeneran berada di dalam kultur, peratus MInya semakin berkurangan.

Bagaimanapun, regeneran daripada semua eksplan regeneratif dan tidak regeneratif menunjukkan kestabilan bilangan kromosom dengan purata 28.3. Julat kromosom bagi tisu regeneratif adalah antara 23-30 dan antara 22-33 bagi tisu tidak regeneratif. Tiada perbezaan bererti ($p > 0.05$) didapati jika dibandingkan dengan bilangan kromosom *in vivo*.

Terdapat sedikit perbezaan taburan kandungan DNA nukleus di antara tisu regeneratif dan tidak regeneratif. Peratus sel yang berada pada fasa G1 bagi kedua-dua tisu regeneratif dan tidak regeneratif didapati adalah rendah (0-2.1%). Namun begitu, didapati fasa S bagi tisu tidak regeneratif adalah lebih tinggi (10.4-21.5%) berbanding tisu regeneratif (5.3-17.2%). Begitu juga dengan fasa G2 di mana tisu tidak regeneratif menunjukkan peratus yang lebih tinggi iaitu 10.7-21.4% berbanding 15.2-18.6% bagi tisu regeneratif. Bagi kedua-dua tisu regeneratif dan tidak regeneratif, peratus poliploid didapati berkurangan dengan bererti ($p < 0.05$) berbanding sel-sel *in vivo*. Namun begitu, peratus sel poliploid tisu regeneratif didapati lebih tinggi berbanding tisu tidak regeneratif. Apabila kurang sel poliploid dan bertambahnya sel pada fasa G2 dan fasa S menyebabkan

lebih banyak sel akan memasuki peringkat mitosis dan ini meningkatkan peratus pembahagian sel. Kekurangan peratus sel poliploid juga mungkin menjadikan sel lebih berpotensi untuk membahagi dan menambahkan bilangan sel untuk organogenesis. Contohnya, bagi tisu regeneratif daripada eksplan pucuk, populasi sel poliploidnya berkurangan sehingga 62.1% berbanding 94.7% dalam keadaan *in vivo* dengan fasa S dan G2 yang tinggi. Peratus MI tisu regeneratif juga tinggi dan turut menyebabkan Cdt yang paling singkat berbanding tisu tidak regeneratif. Namun begitu, bagi eksplan batang bernod pula didapati walaupun peratus poliploidnya adalah tinggi (79.5%), tisuinya masih boleh menghasilkan. Keadaan serupa diperolehi berlaku pada sel regeneratif *Psophocarpus, tetragonolobus* (Abu Shah, 1996) dan *Vicia faba* (Taha dan Francis, 1990).

Walaupun penentuan bilangan kromosom menunjukkan regeneran adalah dalam keadaan diploid ($2n=30$), tetapi taburan DNA nukleusnya didapati mempunyai sel poliploid yang tinggi ($>4.8C$). Taburan kandungan nukleus yang pelbagai dan sel poliploid yang tinggi ini menandakan wujudnya ungkapan sitologi yang boleh menyumbang ke arah variasi somaklon.

Didapati bahawa walaupun peratus poliploid adalah tinggi, namun tisu daripada eksplan batang bernod dan pucuk masih boleh menghasilkan pucuk berganda. Keadaan yang serupa diperolehi daripada *Pisum sativum* (Evans dan Van't Hof, 1975), *Brassica oleraceae* (Murashige dan Nakano, 1967), *Psophocarpus tetragonolobus* (Abu Shah, 1996) dan *Arabidopsis thaliana* (Galbraith *et al.*, 1991).

Apabila eksplan dikultur secara *in vitro*, perubahan keadaan nukleusnya mungkin dipengaruhi oleh keadaan nukleus sel asalnya dalam keadaan *in vivo* dan juga perubahan-perubahan dalam keadaan *in vitro* itu sendiri. Dalam kajian ini, bukan sahaja eksplan akar, malah eksplan batang, batang bernod, daun dan pucuk telah digunakan. Sel-sel daripada eksplan-eksplan ini mempunyai sel meristematik dan juga sel yang telah membeza. Sel-sel yang telah membeza ini selalunya mempunyai campuran pelbagai jenis sel termasuk nukleus normal dan nukleus yang telah menjalani endoreduplikasi (endopoliploid) (D'Amato, 1952). Kerana itulah apabila eksplan yang mempunyai sel yang telah membeza dikultur, banyak sel-sel poliploid akan didapati.

Perubahan nukleus yang berlaku dalam keadaan *in vitro* juga mungkin turut disebabkan oleh faktor *in vitro* sendiri seperti kesan hormon auksin dan sitokinin endogenous atau eksogenous ke atas taburan tahap ploidinya (Liscum dan Hangarter, 1991). Auksin didapati menggalakkan sintesis DNA dan sitokinin diperlukan untuk menyempurnakan mitosis dan sitokinesis (Das *et al.*, 1958; Patau *et al.*, 1957; Skoog dan Miller, 1957). Keadaan ini akan mengganggu beberapa proses seperti replikasi DNA dan sitokinesis yang akan berlaku sebelum masanya. Misalnya, apabila nisbah kepekatan auksin lebih tinggi berbanding sitokinin, sintesis DNA akan berlaku terlalu pantas dan menjadikannya poliploid. Sebaliknya apabila nisbah kepekatan sitokinin lebih tinggi berbanding auksin, sel-sel akan membahagi sebelum cukup matang lalu menyebabkan pemecahan atau kehilangan kromosom semasa mitosis (Liscum dan Hangarter, 1991). Ketidakeimbangan nisbah auksin-sitokinin akan menyebabkan populasi sel

heterogenous dan hasil kultur akan menunjukkan ciri sitologi yang berbeza berbanding eksplan asalnya dan boleh menyebabkan berlakunya variasi somaklon.

Purata luas sel dan luas nukleus tisu tidak regeneratif didapati jauh lebih kecil berbanding tisu regeneratif. Bagi sel daripada eksplan batang bernod contohnya, luas selnya adalah $87.8 \pm 0.2\mu\text{m}^2$ dan luas nukleusnya adalah $24.8 \pm 0.1\mu\text{m}^2$ sementara tisu tidak regeneratif seperti daripada eksplan daun, purata luas selnya cuma $58.8 \pm 0.3\mu\text{m}^2$ dan luas nukleusnya adalah $12.7 \pm 0.1\mu\text{m}^2$. Penggunaan saiz sel dan nukleus secara amnya adalah berkaitan dengan kemampuan organogenesis akar atau pucuk berganda. Ross *et al.*, (1973) melaporkan bahawa saiz sel kultur kalus tembakau yang sedang membentuk pucuk adalah berkurangan. Bagi carnation cv. Grenadin ini, saiz sel dan nukleus regeneran turut lebih kecil berbanding nilai *in vivo* (luas sel, $142.9 \pm 0.6\mu\text{m}^2$ dan luas nukleus $26.6 \pm 0.1\mu\text{m}^2$). Namun begitu, bagi kedua-dua jenis tisu regeneratif dan tidak regeneratif ini, perubahan saiz nukleus didapati bergantung kepada perubahan saiz sel di mana semakin bertambah saiz sel maka semakin meningkat juga saiz nukleusnya.

Tempoh edaran mitosis berkait rapat dengan kandungan DNA dan isipadu nukleus (Van't Hof, 1965). Masa edaran mitosis bertambah dengan bertambahnya kandungan DNA terutamanya pada fasa S. Semakin panjang fasa S maka semakin banyak DNA direplikasikan dan lebih panjang edaran tersebut. Namun begitu, bagi carnation cv. Grenadin, keputusan sebaliknya didapati bagi tisu regeneratif di mana populasi sel-sel yang menunjukkan peratus taburan sel yang tinggi pada fasa S menunjukkan masa panggandaan sel yang lebih rendah. Contohnya, sel-sel pada

fasa S bagi batang bernod ialah 5.3% dan nilai Cdtnya pula adalah 75 jam manakala fasa S bagi pucuk ialah 17.2% dan Cdtnya adalah 62.8 jam. Penemuan ini menyamai kajian serupa ke atas *Petunia hybrida* (Abdullah, 1998). Namun begitu, bagi tisu tidak regeneratif seperti tisu daun contohnya, walaupun peratus fasa S adalah tinggi (21.5%), namun masa penggandaan sel adalah jauh lebih rendah (78 jam). Cdt daripada eksplan batang pula menunjukkan nilai 155.8 jam walaupun peratus fasa Snya adalah hampir sama (21.3%). Secara amnya didapati masa penggandaan sel bagi tisu eksplan regeneratif adalah lebih singkat berbanding tisu tidak regeneratif. Masa yang singkat ini mungkin menunjukkan keupayaan tisu regeneratif untuk membahagi dengan aktif bagi menghasilkan pucuk berganda.

Menurut Murashige (1974a, 1974b), regenerasi pelbagai spesies dan sebahagian besar famili tumbuhan telah berjaya diaplikasikan melalui teknik tisu kultur. Keupayaan mempropagasikan pelbagai spesies tumbuhan ini memberi jaminan kepada tumbuhan yang susah untuk dipropagasikan atau terlalu lambat dipropagasikan untuk dikomersilkan, pengeluaran kultivar baru, stok tumbuhan bebas patogen dan pengawetan plasmajana.

Media MS didapati amat sesuai digunakan untuk percambahan biji benih (m.s. 150) dan regenerasi pucuk berbanding media NN. Di atas media NN (1969), didapati eksplan batang bernod dan pucuk merupakan eksplan paling responsif tetapi bilangan pucuk berganda yang dihasilkan adalah sedikit (1-9) sahaja (Jadual 18, m.s. 151).

Kesan auksin dan sitokinin yang berbeza juga telah dikaji untuk mencari jenis hormon penggalak tumbesaran yang terbaik bagi regenerasi pucuk yang pesat. Kombinasi hormon auksin seperti 2, 4 - D, NAA dan IAA serta hormon sitokinin seperti 2iP, BAP, Kinetin dan Zeatin dengan nisbah 0.5mg/1 sitokinin telah digunakan berdasarkan kepada hormon optima yang didapati pada bahagian 5.3.2.1 (m.s. 123). Bagi eksplan pucuk, kombinasi IAA dan NAA dengan BAP didapati berjaya menghasilkan pucuk yang banyak. Bagi eksplan batang pula, kombinasi 0.5mg/1 NAA dan 1.5mg/1 BAP didapati lebih berkesan untuk menghasilkan pucuk berbanding Kinetin, Zeatin dan 2iP. Pemerhatian yang serupa juga ditemui oleh Nugent *et al.*, (1991).

Kultur eksplan batang bernod dan pucuk turut dilakukan di dalam media cecair 1/3 MS yang ditambah dengan 30g/1 sukrosa. 3-15 pucuk berganda per eksplan diperolehi lengkap bersama pembentukan akar. Namun begitu, semua plantlet yang terbentuk mengalami vitrifikasi. Masalah ini dapat diatasi selepas plantlet ini dipindahkan ke atas media MS pepejal yang ditambah dengan 0.5mg/1 NAA dan 1.5mg/1 BAP, 30g/1 sukrosa dan 8g/1 agar teknikal. Plantlet normal berjaya diaklimisasikan dan hidup subur di rumah kaca.

Satu masalah yang timbul di samping kejayaan mempropagasikan carnation cv. Grenadin secara *in vitro* telah dikesan semasa kajian kesan sukrosa dan media cecair ke atas eksplan sedang dikaji. Vitrifikasi, translusensi, sukulensi dan 'glassiness', semua istilah ini merujuk kepada kelainan fisiologi dan morfologi tumbuhan yang ditanam melalui teknik kultur tisu. Tumbuhan yang mengalami

vitrifikasi ini menunjukkan ciri berkaca, pertumbuhan yang terencat atau tumbesaran yang berkurangan, sifat tumbuh secara berkelompok, tebal, batang dan daunnya berbentuk tidak sempurna dan sel-sel korteks serta parenkima empulur menjadi hipertrofi (Kevers *et al.*, 1984; Phan dan Hegedus, 1986; Ziv *et al.*, 1987a)

Vitrifikasi merupakan masalah yang besar dalam industri kultur tisu memandangkan ia mempengaruhi penggandaan pucuk dan kesuburan kultur (Hammerschlag, 1986) dan boleh mengurangkan kejayaan pemindahan tumbuhan yang telah berjaya dikultur kepada tanah kebun. Menurut Paques dan Boxus, (1987), lebih 60% daripada tumbuhan yang mengalami vitrifikasi gagal untuk diaklimatisasikan dan dengan itu ia menghadkan aplikasi teknik *in vitro* untuk propagasi pesat.

Bagi *Picea abies* (Bornman dan Vogelmann, 1984) vitrifikasi boleh disebabkan oleh kepekatan sitokinin yang tinggi. Leshem *et al.*, (1988b) turut mengesahkannya berlaku pada *Dianthus caryophyllus*. Agar pemekat di dalam media juga merupakan satu faktor yang menggalakkan vitrifikasi. Gelrite misalnya, menggalakkan vitrifikasi epal (Pasqualetto *et al.*, 1988) dan *Clanthus formosus* (Taji dan Williams, 1989). Vitrifikasi juga menyebabkan tumbuhan menyerap air secara berlebihan dan menjadikan daun serta batangnya bertumbuh dalam keadaan tidak sempurna. Bagi daun *Dianthus caryophyllus*, Ziv *et al.*, (1983) mendapati perbezaan lapisan mesofil palisad dan mesofil berspannya menjadi kurang jelas dan ruang antara selnya juga adalah besar. Di dalam kajian

ke atas carnation cv. Grenadin ini, didapati kepekatan sukrosa memainkan peranan penting dalam pembentukan pucuk yang mengalami vitrifikasi. Apabila 10g/l, 20g/l dan 40g/l sukrosa ditambahkan ke dalam media, vitrifikasi didapati berlaku pada pucuk berganda carnation yang dikultur. Namun begitu, pada kepekatan sukrosa 30g/l, pucuk-pucuk berganda didapati tumbuh dengan sihat, normal dan 'vigour'. Kesan jenis dan kepekatan karbohidrat di dalam media ke atas vitrifikasi telah dilaporkan oleh Orlikowska (1987).

Kejayaan sistem kultur tisu adalah tidak bermakna sekiranya tumbuhan yang berjaya dipropagasikan gagal untuk menyesuaikan diri dengan persekitaran sebenar di luar dari keadaan *in vitro*. Carnation berpotensi besar dalam industri florikultur negara sebagai bunga keratan yang dieksport ke luar negara dan untuk pasaran tempatan. Dalam kajian ini usaha untuk memindahkan plantlet dari bekas *in vitro* di makmal ke tanah telah berjaya dilakukan. Tiga kaedah pemindahan plantlet telah dicuba (lihat m.s. 117) dan satu kaedah terbaik telah dijumpai berjaya membuatkan carnation tersebut meneruskan tumbesaran sehingga ke peringkat kematangannya dengan peratus kejayaan melebihi 80% (Jadual 19 m.s. 158).

Kaedah aklimatisasi yang sesuai memerlukan media tanah bakar yang poros dan campuran pasir serta tanah 'top soil'. Campuran tanah ini mewujudkan saluran yang baik supaya air tidak bertakung. Ini adalah kerana takungan air boleh mengurangkan kandungan oksigen di dalam tanah dan menyebabkan akar carnation mati. Campuran tanah lain yang sesuai adalah dengan menggunakan

habuk papan, tanah gambut, perlite dan pasir. Campuran ini bukan sahaja menyediakan perkembangan akar yang baik malahan juga mengalirkan air dan udara yang baik. Di samping media yang sesuai, suhu siang hari yang ideal ialah antara 18-24° C dan suhu malamnya antara 14-16° C. Suhu yang tinggi menyebabkan carnation tidak berbunga. Kelembapan udara yang sesuai untuk carnation ialah 60-80%. *Dianthus caryophyllus* cv. Grenadin didapati hidup subur dengan cahaya matahari penuh. Ketinggian pokok boleh mencapai sehingga 50cm.

Penentu utama kejayaan kaedah pemindahan plantlet ke tanah ini adalah proses 'hardening' iaitu proses perantaraan sebelum pokok-pokok tersebut dipindahkan ke rumah kaca. Proses 'hardening' ini penting untuk membiasakan plantlet dengan media batu (tanah) dan kelembapan relatif persekitaran yang rendah berbanding di dalam bekas kultur. Semasa proses 'hardening', sesekali plastik (penutup) dibuka untuk membiasakan pokok secara beransur-ansur kepada persekitaran luar. Seminggu sebelum dibawa ke rumah kaca, pokok carnation dibiasakan dengan suhu bilik tanpa menggunakan penutup lagi. Cara ini turut dilakukan oleh Ziv (1986) terhadap carnation dan Ripley dan Preece (1986) terhadap *Euphobia lathyris*.

Menurut Preece dan Sutter (1991), proses penyesuaian diri dengan iklim boleh bermula ketika plantlet masih dalam keadaan *in vitro*. Sutter dan Langhans (1982) mendedahkan plantlet kobis kepada kelembapan relatif yang rendah (35%) sahaja ketika masih dalam keadaan *in vitro*. Pada awalnya tumbuhan tersebut

menunjukkan tanda-tanda layu tetapi kemudiannya ia berjaya menyesuaikan diri dengan keadaan tersebut. Wardle *et al.*, (1979) pula meletakkan bahan penyerap kelembapan ke dalam bekas kultur dengan tujuan untuk merendahkan kelembapan relatif semasa di dalam keadaan *in vitro*.

Kajian menggunakan mikroskop elektron ke atas daun tembakau (Grout, 1975) mendapati plantlet yang diregenerasikan melalui sistem kultur tisu mempunyai lapisan epikutikel yang nipis. Grout dan Aston (1978) menjelaskan bahawa anatomi daun plantlet *in vitro* menunjukkan berkurangnya sel-sel palisad pada daun plantlet tersebut. Kekurangan sel palisad menyebabkan ruang antara selnya bertambah besar (Brainerd *et al.*, 1981). Selain itu, daun-daun mempunyai kandungan sitoplasma yang terhad, kloropias yang leper, sistem membran yang luarbiasa dan saiz liang stoma yang besar (Conner dan Conner, 1984). Ciri-ciri anatomi yang tidak sempurna ini menjadikan sesetengah tumbuhan sukar untuk menyesuaikan diri dengan keadaan persekitaran luar yang amat berbeza dengan persekitaran kultur.

Di dalam kajian ini, carnation telah berjaya diaklimatisasikan dan hidup subur di rumah kaca. Tumbuhan yang berjaya menyesuaikan diri dengan persekitaran luar didapati menunjukkan perubahan anatomi sedikit demi sedikit selaras dengan perubahan iklim. Wetzstein dan Sommer, (1982) dan Donnelly *et al.*, (1985) mendapati bahawa tumbuhan yang berjaya dipindahkan ke tanah mempunyai ketumpatan sel yang tinggi, lapisan kutikelnnya terbentuk dengan sempurna, sel-sel kolenkima, sklerenkima dan sel-sel empulurnya didapati berdinding tebal.

Regeneran bagi kebanyakan spesies seringkali menunjukkan perubahan morfologi dan sitologi akibat situasi dalam sistem kultur tisu (Evans, 1989). Perubahan yang berlaku pada peringkat sel akan ditunjukkan pada ciri-ciri morfologi tumbuhan tersebut. Pemerhatian ke atas regeneran carnation cv. Grenadin didapati tidak menunjukkan kelainan morfologi berbanding tumbuhan yang di tanam secara secara *in vivo*. Pemerhatian yang sama diperolehi daripada kajian ke atas *Lotus corniculatus* (Webb dan Watson, 1991) dan *Petunia hybrida* (Abdullah, 1998).

Analisa sitologi ke atas carnation menunjukkan terdapatnya frekuensi paras ploidi yang tinggi dengan kehadiran sel-sel poliploid. Kehadiran poliploid juga dikesan pada klon kentang dan *Solanum tuberosum* cv. 'Bintje' (Binding *et al.*, 1970). Namun begitu, tiada perubahan yang ditunjukkan pada sifat-sifat fenotip tumbuhan memandangkan tumbuhan induk carnation cv. Grenadin ini sememangnya telah menunjukkan ciri poliploid dan berjaya hidup dengan subur. Kemampuan *Dianthus caryophyllus* cv. Grenadin untuk dipropagasikan dengan pesat melalui teknik kultur tisu dan kestabilan genetik yang dimiliki mengesahkan bahawa spesies ini boleh dikomersilkan secara besar-besaran.