

## BAB 8 : KESIMPULAN

Daripada eksperimen piawai didapati purata panjang akar primer anak cambah *Dianthus caryophyllus* Linn cv. Grenadin (carnation) yang berusia 4 hari ialah  $11.15 \pm 0.33$  mm. Biji benih carnation telah dicambahkan secara aseptik pada kala cahaya 16 jam cahaya dan 8 jam gelap dan pada suhu  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ . Kadar pemanjangan akar primer carnation ialah  $2.96$  mm hari $^{-1}$ . Disebabkan eksperimen yang dijalankan melibatkan teknik kultur tisu, keputusan yang didapati daripada anak cambah berusia 4 hari dan dicambahkan secara aseptik telah digunakan sebagai piawai untuk memilih akar-akar bagi eksperimen yang melibatkan kajian sitologi *in vivo* dan *in vitro*.

Nilai purata indeks mitosis (MI) yang dikultur pada sel-sel meristem hujung akar primer carnation dengan panjang 2 mm ialah  $43.51 \pm 2.14\%$ . Purata bilangan kromosom diploid carnation yang didapati adalah  $29.73 \pm 0.12$  dan nilai ini menghampiri nilai 30 ( $2n=2x=30$ ) dengan julat 29-30 kromosom untuk setiap sel. Perubahan luas nukleus didapati berkadar terus dengan luas selnya. Purata luas sel meristem akar carnation yang ditanam secara *in vivo* adalah  $142.90 \pm 0.59 \mu\text{m}^2$  dan purata luas nukleusnya adalah  $26.59 \pm 0.09 \mu\text{m}^2$ . Taburan kandungan DNA nukleus adalah di antara 3.4 - 13.0C. Tiada sel didapati berada pada fasa G1 edaran sel, cuma 1.32% pada fasa S, 3.95% pada fasa G2 dan 94.74% adalah poliploid. Sel-sel primer carnation yang ditanam secara *in vivo* ini memerlukan 66.11 jam untuk menggandakan populasinya.

Secara umumnya, apabila sel-sel meristem akar carnation yang ditanam secara *in vivo* dipindahkan kepada keadaan *in vitro* dan dikultur di atas media MS yang ditambah dengan 2 mg/l NAA, purata nilai MI nya didapati menjadi lebih rendah. Pada empat hari pertama di dalam kultur, nilai MI turun dengan signifikan ( $p<0.05$ ) berbanding nilai MI sel dalam keadaan *in vivo* yang mana ia mungkin diakibatkan oleh kejutan dan ganguan persekitaran *in vitro*. Nilai MI tertinggi yang diperolehi adalah pada minggu ke 3 di dalam kultur iaitu 43.77%. Namun begitu, nilai ini tidak berbeza dengan signifikan ( $p>0.05$ ) berbanding nilai MI sel-sel akar yang ditanam secara *in vivo* (43.51%).

Purata bilangan kromosom adalah stabil di sepanjang kultur iaitu menghampiri nilai kromosom diploid  $2n=2x=30$  dengan julat di antara 25-33 kromosom per sel. Taburan kandungan DNA nukleus menunjukkan peratus sel-sel poliploid yang tinggi sepanjang 6 bulan dikultur. Peratus poliploid yang tinggi ini mungkin disebabkan oleh sumber eksplan asalnya yang turut mempunyai ploidi yang tinggi dan kemungkinan juga eksplan yang digunakan mempunyai tisu-tisu matang yang telah membeza. Pada hari pertama dikultur, 100% sel menunjukkan poliploid. Tahap ploidi menurun semula pada hari ke 2 sehingga 3 minggu di dalam kultur kepada 67.33%. Seterusnya selepas 4 minggu dikultur, tahap ploidi meningkat semula dan didapati nilainya turun naik sehingga 6 bulan dikultur. Penurunan tahap ploidi pada 3 minggu pertama di dalam kultur mungkin dipengaruhi oleh keaktifan sel-sel akar primer membahagi untuk menghasilkan akar sekunder. Turun naik tahap ploidi pada peratusan yang tinggi dan tidak menentu ini mungkin menjadi menyebab ketidakupayaan sel-sel akar meregenerasikan pucuk berganda.

Perubahan luas sel dan luas nukleus didapati bersandar antara satu sama lain. Semakin besar luas sel, maka luas nukleus turut meningkat. Purata luas sel terendah ialah  $83.27 \pm 0.31 \mu\text{m}^2$  dan luas nukleusnya  $17.66 \pm 0.06 \mu\text{m}^2$  iaitu selepas 3 minggu di dalam kultur. Ini mungkin disebabkan pada minggu ke 3, nilai MI adalah tertinggi dan diadapti sel-sel yang baru membahagi sememangnya mempunyai luas sel yang kecil. Luas sel terbesar pula adalah selepas 1 minggu dikultur iaitu  $181.48 \pm 0.49 \mu\text{m}^2$  dan luas nukleusnya adalah  $43.95 \pm 0.28 \mu\text{m}^2$ . Didapati pada usia 1 minggu dikultur ini kebanyakan sel-sel berada pada fasa G2 (22.82%) yang mana sememangnya luas sel menjadi lebih besar selepas direplikasikan.

Masa penggandaan sel bagi eksplan carnation yang berusia 3 minggu dan dikultur secara *in vitro* adalah 96.07 jam ia menunjukkan masa penggandaan sel yang lebih lama berbanding sel-sel carnation yang ditanam secara *in vivo* iaitu 66.11 jam. Ini mungkin disebabkan peratus sel yang berada pada fasa G2 bagi sel akar *in vitro* lebih tinggi berbanding *in vivo*.

Di dalam kajian kultur tisu, eksplan batang bernod dan pucuk yang berusia 3 minggu didapati paling responsif untuk meregenerasikan pucuk berganda berbanding eksplan batang, daun dan akar. Media optima untuk regenerasi pucuk bagi eksplan batang bernod dan pucuk adalah MS yang ditambah dengan 0.5 mg/l NAA dan 1.5 mg/l BAP, pH 5.8, 30 g/l sukrosa, 8 g agar dan diletakkan di dalam bilik kultur bersuhu  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  dengan kala cahaya 16 jam cahaya dan 8 jam gelap.

Kepekatan sukrosa yang digunakan adalah penting bagi mengelakkan vitrifikasi berlaku. Didapati 30 g/l sukrosa di dalam media optima dapat menghindari masalah vitrifikasi pada pucuk dan batang carnation. Selain daripada menggunakan medai beragar, pucuk-pucuk berganda mampu terbentuk apabila eksplan pucuk dan batang bernod dikultur di dalam media cecair 1/3 MS dan ditambah 30 g/l sukrosa. Walaupun terdapat masalah vitrifikasi, namun masalah ini berjaya diatasi dengan cara memindahkannya ke media beragar MS yang ditambah dengan 0.5 mg/l NAA dan 1.5 mg/l BAP. Plantlet berjaya diaklimatisasikan ke tanah selepas 10 minggu dikultur.

Media Murashige dan Skoog (MS) (1962) didapati lebih sesuai digunakan berbanding media Nistch dan Nistch (NN) (1969) untuk meregenerasikan pucuk. Kajian terhadap hormon penggalak tumbesaran jenis auksin dan sitokinin yang paling baik untuk regenerasi carnation didapati adlah 0.5 mg/l NAA dan 1.5 mg/l BAP. Kombinasi hormon IAA, 2,4-D, 2iP, Zeatin dan Kinetin juga berupaya menghasilkan pucuk berganda tetapi pada peratus yang lebih rendah.

Aklimatisasi berjaya dilakukan dan regeneran didapati tumbuh subur di rumah hijau. Namun begitu, disebabkan faktor suhu, keamatan cahaya, pH tanah dan ketinggian daripada aras laut yang tidak sesuai untuk pembungaan carnation, tumbuhan ini didapati gagal untuk berbunga dan kekal pada peringkat vegetatif sahaja. Kajian selanjutnya mengenai pembungaan mungkin dapat mengatasi masalah ini. Disebabkan kajian ini masanya terhad maka kajian pembungaan tidak dapat diteruskan.

Oleh kerana cuma eksplan pucuk dan batang bernod sahaja didapati memberikan respon terhadap pembentukan pucuk berganda apabila dikultur di atas media MS yang ditambah dengan 2 mg/l NAA, kajian sitologi turut dijalankan ke atas tisu eksplan regeneratif iaitu pucuk dan batang bernod serta tisu eksplan tidak regeneratif iaitu batang, daun dan akar. Kajian lebih ditumpukan ke atas tisu regeneratif dan pemerhatian dijalankan pada usia 3 minggu, 2 bulan dan 3 bulan selepas dikultur. Pemerhatian ke atas tisu eksplan tidak regeneratif cuma dijalankan selepas 3 minggu dikultur. Oleh itu, perbandingan kelakuan sel di antara tisu eksplan regeneratif dan tidak regeneratif adalah selepas 3 minggu ianya dikultur.

Secara umumnya, purata nilai indeks mitosis (MI) bagi kedua-dua jenis tisu regeneratif dan tidak regeneratif adalah tinggi iaitu di antara 36-43%. Bagi eksplan pucuk dan batang bernod, didapati purata niali MI semakin berkurangan apabila semakin berada di dalam kultur. Purata bilangan kromosom bagi tisu regeneratif dan tidak regeneratif adalah hampir sama dengan purata 28.3 kromosom dalam keadaan diploid. Terdapat sedikit perbezaan taburan kandungan DNA nukleus bagi tisu regeneratif dan tidak regeneratif. Peratus sel-sel yang berada pada fasa S dan G2 tisu tidak regeneratif didapati lebih tinggi daripada tisu regeneratif. Peratus sel poliploid bagi kedua-dua jenis tisu pula didapati lebih rendah berbanding sel-sel *in vivo*.

Namun begitu, tisu eksplan regeneratif didapati mempunyai peratus poliploid yang lebih tinggi daripada tisu tidak regeneratif. Apabila bertambah fasa S dan G2

pada tisu tidak regeneratif dan kurangnya sel-sel poliploid, maka dipercayai lebih banyak sel yang memasuki mitosis dan meningkatkan niali MI. Peningkatan nilai MI ini menunjukkan pembahagian sel berlaku dengan pesat. Pembahagian sel yang pesat juga menyebabkan luas sel dan nukleus tisu tidak regeneratif didapati lebih kecil berbanding tisu regeneratif. Namun begitu, didapati masa penggandaan sel bagi tisu tidak regeneratif jauh lebih panjang berbanding tisu regeneratif. Contohnya, Cdt bagi eksplan pucuk cuma 62.8 jam berbanding 155.8 jam bagi eksplan batang. Maka walaupun pembahagian berlaku dengan begitu pesat pada tisu tidak regeneratif tetapi ia mengambil masa yang lama untuk melengkapkan satu kitaran mitosisnya. Keupayaan membahagi dalam masa yang lebih singkat bagi tisu eksplan regeneratif mungkin mempengaruhi kemampuannya menghasilkan pucuk berganda.

Satu perkara yang menarik bagi regenerasi carnation cv. Grenadin ini adalah eksplan regeneratifnya mempunyai banyak sel-sel poliploid dengan peratus yang tinggi, ia didapati mampu untuk meregenerasikan pucuk-pucuk berganda dengan banyak. Ini menunjukkan sel-sel poliploid bagi spesies ini tidak merencatkan kebolehan meregenerasikan pucuk baru dan spesies ini didapati mengekalkan sifat poliploid sel induk *in vivonya* apabila dikultur secara *in vitro*. Regenerasi hasil kultur yang diperolehi telah berjaya diaklimatisasikan dan tiada perbezaan fenotip yang diperhatikan. Carnation juga merupakan satu spesies tumbuhan yang stabil dari segi aktiviti sel semasa berada dalam sistem kultur.