

BAB 1 : PENGENALAN DAN TINJAUAN PERPUSTAKAAN

Tumbesaran boleh ditakrifkan sebagai pertambahan isipadu yang tidak berbalik. Bagi tumbuhan, tumbesaran dicapai dengan kombinasi pembahagian dan pemanjangan sel. Wareing dan Phillips (1981) menggunakan istilah tumbesaran ini dengan merujuk kepada perubahan kuantitatif yang berlaku semasa perkembangan tumbuhan. Ia juga boleh ditakrifkan sebagai perubahan tidak berbalik yang melibatkan pertambahan dalam bilangan sel, hasil daripada pembahagian dan pertambahan saiz sel, organ atau keseluruhan organisma. Menurut Esau (1977), proses tumbesaran melibatkan pembentukan sel-sel baru di samping pembesaran dan perkembangan sel-sel secara tidak berbalik. Menurut Esau (1977) lagi, tumbesaran bagi tumbuhan multisel melibatkan pertambahan bilangan oleh pembahagian dan pertambahan saiz sel.

Kemampuan semulajadi bagi setiap sel tumbuhan untuk berkembang menjadi tumbuhan lengkap dikenali sebagai totipotensi sel. Dalam teknik kultur tisu, untuk menggambarkan totipotensi sel-sel yang telah membeza ia akan terlebih dahulu menjalani peringkat pembezaan balik (dedifferentiation) dan diikuti dengan peringkat pembezaan semula (redifferentiation). Pembezaan balik adalah keadaan di mana sel-sel matang berbalik ke peringkat meristematik dan membentuk tisu-tisu kalus yang tidak terbeza. Bagaimanapun, eksplan embrionik biasanya membeza membentuk akar, pucuk atau embrio tanpa memasuki fasa kalus. Eksplan multisel selalunya terdiri daripada pelbagai jenis sel. Akibatnya, kalus yang terbentuk daripadanya

adalah heterogenous dan berkebolehan untuk membentuk tumbuhan lengkap atau organ-organ tumbuhan (pembezaan semula).

Bagi tumbuhan peringkat tinggi, pembahagian sel berlaku dengan pesat pada bahagian meristematik seperti pada meristem akar dan pucuk. Meristem hujung akar dan pucuk ini biasanya tetap kekal aktif dan berupaya bertumbesar pada tempoh masa yang lama. Bahagian meristem hujung sesuatu tumbuhan merupakan pusat perkembangan atau morfogenesis di mana dari bahagian inilah munculnya tisu-tisu baru. Bentuk pembezaan sel ditentukan oleh frekuensi pembahagian sel mengikut orientasi dinding-dinding sel yang baru (Luxova, 1975). Pembahagian jenis periklinal akan meningkatkan bilangan lapisan sel dan membesarkan saiz diameter organ tersebut. Manakala pembahagian jenis antiklinal akan meningkatkan bilangan sel bagi setiap satu lapisan tersebut. Pembahagian secara melintang serentak dengan pemanjangan sel memberi sumbangan terhadap pemanjangan akar. Ketiga-tiga jenis pembahagian ini turut berlaku di kawasan hujung pucuk. Walau bagaimanapun, hujung pucuk menunjukkan bentuk tumbesaran yang lebih kompleks dengan kehadiran primordia daun dan primordia bunga.

Selain daripada bahagian meristem hujung akar dan pucuk yang aktif bertumbesar, bahagian lain yang turut meristematik termasuklah primordia daun, meristem basal daun, zon kambium dan prokambium serta perisikel. Namun begitu, hujung akar adalah bahagian organ yang lebih mudah untuk menjalankan kajian pembahagian sel

dan lain-lain komponen tumbesaran tumbuhan peringkat tinggi berbanding dengan meristem yang lain (Bertaud *et al.*, 1986).

Meristem akar juga menunjukkan corak tumbesaran yang lebih mudah berbanding meristem hujung pucuk (Torrey, 1972). Hujung akar merupakan pusat penting bagi organisasi perkembangan tumbuhan peringkat tinggi. Ia adalah tapak di mana sel-sel baru dibentuk oleh pembahagian sel yang berterusan. Hujung akar ini merupakan struktur stabil untuk aktiviti pembentukan sel-sel baru dan penentuan corak tisu (Torrey, 1972). Ciri lain yang istimewa pada meristem akar tumbuhan peringkat tinggi adalah kewujudan pusat kuisen, sekumpulan sel-sel yang terletak hampir di hujung akar yang mana edaran selnya sama ada perlahan pada fasa G1 atau tidak beredar pada fasa G0. Sejak dijangka kewujudannya (Clowes, 1954) dan penemuannya (Clowes, 1956), banyak kajian telah dijalankan ke atas pusat kuisen ini. Pusat kuisen didapati boleh meregenerasi menjadi tumbuhan lengkap apabila dipotong dan diletakkan di dalam keadaan *in vitro* (Feldman, 1976). Malahan didapati pusat kuisen mengandungi 'reservoir' sel-sel asas yang memiliki banyak ciri-ciri yang berkaitan dengan sel-sel batang (Barlow, 1978).

Model meristem hujung akar telah dibuat oleh Davidson *et al.*, (1978) di mana ia terdiri daripada pusat kuisen yang dibentuk oleh sekumpulan sel yang tidak aktif membahagi. Apabila pembahagian sel berlaku, sel-sel ini didapati terletak di kawasan meristem yang jauh daripada pusat kuisen. Sel-sel yang terdapat di kawasan meristem didapati membahagi dengan aktif. Sel-sel beredar daripada kumpulan sel proliferatif

pada masa-masa yang berbeza dalam fasa tumbesarannya dan pada posisi yang berbeza disepanjang kolum sel. Bergantung kepada jenis sel apa yang akan terbentuk, sel-sel membeza pada jarak yang berlainan daripada pusat kuisennya. Semua perubahan ini didapati wujud di antara 1-1.5mm daripada sempadan hujung pusat kuisen.

Meristem akar mempunyai bahagian berbeza yang sama seperti tisu-tisu akar matang (Clowes, 1976a). Keratan memanjang hujung akar yang muda secara tipikalnya mempunyai empat bahagian sel dengan ciri-ciri yang berbeza. Di hujung akar adalah kumpulan sel-sel pertahanan yang membentuk jidal akar. Jidal akar mengandungi sel-sel parenkima hidup yang selalunya mempunyai kanji dan terletak pada hujung akar. Fungsinya adalah untuk melindungi meristem akar dan membantu akar untuk menembusi ke dalam tanah bagi mendapatkan garam galian semasa tumbesaran berlaku. Di belakang jidal akar ini adalah kawasan meristematik yang sel-selnya berdinding nipis dan berbentuk segiempat dengan sitoplasma yang pekat. Aktiviti mitosis selalunya boleh dilihat di kawasan ini. Apabila bilangan sel bertambah, sebahagiannya akan ditambah pada jidal akar dan sebahagian yang lain ke bahagian pemanjangan sel yang terletak di atas zon meristematik. Di dalam zon pemanjangan ini, sel-sel menambah saiznya, biasanya pada arah longitudinal. Selepas zon meristematik ini terletak zon pembezaan dan pematangan. Sel-sel yang mula terbentuk pada zon pemanjangan akan hilang kapasiti untuk terus berkembang dan akhirnya membeza menjadi epidermis, korteks dan tisu penyaluran (Kozlowski, 1971).

Sel-sel epidermis akar selalunya berdinding nipis dan biasanya tanpa kutikel. Ciri istimewa epidermis akar adalah kehadiran rerambut akar yang disesuaikan untuk penyerapan air dan garam mineral yang berkesan. Korteks akar mengelilingi sistem penyaluran dan dalam kebanyakan tumbuhan dikotiledon, ia mengandungi sel-sel parenkima (penyimpanan). Pada lapisan dalam korteks terdapatnya endodermis. Dinding sel-sel endodermis ini mengandungi suberin dan membentuk kawasan jaluran yang dipanggil Jalur Casparian (Peirson dan Dumbroff, 1969). Fungsinya adalah untuk menapis dan melindungi tumbuhan daripada mengambil terlebih garam. Sistem penyaluran pula terdiri daripada xilem dan floem yang terletak di bahagian tengah akar. Bagi tisu vaskular primer, ia dikelilingi oleh sel-sel silinder yang dipanggil perisikel. Tisu-tisu ini biasanya mengandungi satu atau lebih lapisan sel parenkima yang berdinding nipis. Perisikel ini mengandungi 'progenitor' untuk pembentukan primordia akar sisi.

Meristem akar angiosperma selalunya digambarkan sebagai sistem terbuka atau tertutup, iaitu meristem dengan jidal diskrit (tertutup) atau dengan perubahan sel yang nyata di antara sel korteks dengan jidal (terbuka). Meristem hujung *Vicia faba* contohnya menunjukkan meristem jenis terbuka dan dicirikan dengan perubahan berterusan di antara sistem penyaluran dengan jidal akar (Clowes, 1972, 1981).

Pembahagian sel melibatkan replikasi semua organel-organel sel dan bagi proses ini nukleus adalah organel yang paling intensif dikaji. Peringkat pembahagian nukleus melibatkan pembentukan kromosom dan proses mitosis berselang seli dengan tempoh

di mana nukleus berada pada peringkat rehat yang dirujuk sebagai interfasa. Mitosis adalah proses pembahagian sel yang mana kromatid-kromatid daripada setiap genom kromosom berpisah menghasilkan bilangan kromatid yang sama pada setiap sel anak. Hasil daripada pembahagian mitosis ini, setiap satu daripada dua sel anak adalah lebih kecil daripada sel induknya. Pada tumbuhan, pembahagian sel induk seringkali menghasilkan pembentukan sel anak yang sama saiz. Menurut Armstrong dan Francis (1985), pembahagian sel tumbuhan selalunya adalah asimetrik. Sel-sel anak ini kemudiannya meneruskan pembesaran dan tumbesaran sel melibatkan sintesis sitoplasma serta bahan-bahan dinding sel.

Seperti yang kita ketahui, sel reproduksi tumbuhan didapati di kawasan meristem. Teknik yang paling biasa untuk menguji kelakuan nukleus yang membahagi adalah dengan mengawetkan sel-sel, mewarnakan dengan pewarna spesifik DNA (biasanya dengan reagen Feulgen) dan dibuat slaid untuk menghasilkan selapisan sel. Kebanyakan sel-sel pada hujung akar adalah pada peringkat interfasa, kerana peringkat ini biasanya berlaku paling lama berbanding mitosis. Pada peringkat ini, nukleus mudah dilihat dan dikelilingi oleh sampul nukleus. Kromatin kelihatan seolah-olah homogenus. Satu atau dua nukleolus boleh dilihat. Semasa interfasa, nukleus dan sitoplasma menambahkan isipadunya dan sintesis DNA aktif berlaku.

Peringkat pertama mitosis adalah profasa, yang mana ia dicamkan apabila kromatin kelihatan jelas dan panjang dengan bebenang kromosom. Setiap kromosom terdiri daripada dua kromatid. Semasa profasa, sampul nukleus musnah, nukleolus hilang

atau saiznya menyusut dan kromosom seolah-olah berada di dalam sitoplasma. Gelendung bipolar terbentuk di antara dua kutub. Kromosom terletak pada gentian gelendung dengan sentromernya.

Pada peringkat metafasa, kromosom-kromosom didapati tersusun lurus pada satu garisan. Seterusnya, peringkat anafasa bermula apabila sentromer bertindak seperti satu unit, membahagi dan mula berpisah. Semasa anafasa, dua kumpulan kromatid yang mana setiap satunya mewakili separuh daripada kromosom asal bergerak ke kutub yang bertentangan. Telofasa bermula apabila sentromer tiba pada kutub gelendung. Semasa telofasa, kromatid-kromatid menjadi tumpat semula dan akhirnya sampul nukleus mula terbentuk mengelilingi setiap sel anak serta nukleolus kembali muncul. Akhirnya, pembahagian sel sebenar atau sitokinesis berlaku dengan melibatkan pembentukan dinding sel di antara nukleus dua sel anak. Kedua-dua sel baru ini, setiap satunya dengan nukleus yang mengandungi informasi penuh daripada sel induknya. Nukleus sel anak ini kemudiannya berada pada interfasa semula (Swanson dan Webster, 1977).

Tidak seperti haiwan yang mana pembezaan selalunya tidak berbalik, bagi tumbuhan walaupun ia telah matang dan sel-selnya telah membeza sekalipun, ia mempunyai kebolehan berbalik menjadi sel meristematik asalkan ianya mempunyai sistem membran yang 'intact' dan nukleus yang boleh hidup bersendirian.

Istilah 'pembezaan' digunakan pada mana-mana situasi apabila sel-sel meristematik membentuk dua atau lebih sel, tisu atau organ yang mana secara kualitatifnya berbeza antara satu sama lain (Wareing dan Phillips, 1981). Pada tahap sel, pembezaan kadang kala digunakan pada dua keadaan yang berlainan. Pertama, pembezaan mungkin digunakan untuk perkembangan sel-sel matang yang berbeza pengkhususannya di dalam organ dan tisu. Keduanya, ia mungkin digunakan untuk merujuk kepada perubahan yang wujud sepanjang perkembangan sel-sel meristematik menjadi sel matang, biasanya melibatkan vakuolasi dan pembesaran. Kadang kala, istilah pematangan digunakan untuk proses-proses yang menjurus ke arah pembentukan sel matang daripada peringkat meristematik. Pematangan melibatkan vakuolasi dan pembesaran sel (Jensen, 1960). Sel-sel yang menjalani pematangan secara relatifnya menunjukkan perubahan-perubahan lain dari segi struktur seperti pembentukan tisu parenkima atau perubahan pada pembentukan xilem dan floem.

Satu daripada aspek jelas pembezaan meristem hujung adalah perubahan saiz dan bentuk sel. Banyak kajian telah dibuat pada akar berbanding organ-organ lain. Menurut Cuadrado *et al.*, (1987), kebolehan sel-sel untuk membeza adalah berhubungkait dengan saiz sel di mana semakin besar saiz sel, semakin cepat sel membeza. Beliau menjalankan kajian ke atas meristem akar *Allium cepa* mencadangkan bahawa saiz sel adalah perlu sebagai faktor dan langkah yang bertanggungjawab untuk permulaan perkembangan yang menggalakan sel-sel meristematik untuk membeza.

Kultur tisu membolehkan analisa lengkap turutan tindakan daripada peringkat mula dan mekanisme yang terlibat sepanjang tumbesaran sesuatu tumbuhan. Mekanisme pembezaan boleh difahami secara langsung dengan teknik kultur tisu. Pengkulturan sesuatu tisu mempunyai kapasiti tumbesaran yang tidak terhad dan memberi skop yang besar untuk kajian tentang pembezaan. Pembezaan melibatkan pembentukan organ-organ yang berlainan daripada tisu yang berpotensi dan mampu membentuk daripada tisu asal menjadi pelbagai jenis tisu-tisu lain sepanjang tumbesaran dan perkembangannya. Justeru itu, dalam sistem kultur tisu, analisa kimia, morfologi dan kelakuan sel yang berasosiasi dengan transformasi pembentukan organ-organ yang berbeza didapati merupakan pendekatan berguna untuk memahami lebih mendalam tentang mekanisme yang terlibat di dalam proses pembezaan.

Hampir semua maklumat yang diperolehi mengenai tempoh dan ciri-ciri sitologi kitaran sel datang daripada kajian meristem hujung akar anak cambah tumbuhan angiosperma (Yeoman, 1981). Howard dan Pelc (1953) menunjukkan bahawa kitaran sel adalah proses yang beredar di mana sel induk melalui satu siri fasa sintesis dan akhirnya membahagi membentuk dua sel anak di mana bagi setiap sel anak ini secara genetiknya identikal dengan sel induknya.

Kitaran sel bagi eukariot dibahagikan kepada dua peringkat iaitu interfasa dan mitosis. Secara puratanya, interfasa melibatkan kira-kira 95% daripada kitaran dan semasa waktu ini, komponen-komponen sel seperti DNA nukleus akan berganda dua. Semasa mitosis, produk-produk interfasa secara fizikalnya akan dipisahkan kepada

dua dengan mengambil kira penghasilan pemisahan ini menghasilkan kromosom-kromosom yang tepat.

Fakta yang mengatakan bahawa interfasa bagi sel-sel yang sedang membahagi mempunyai 3 fasa telah dikenalpasti oleh Howard dan Pelc (1953). Fasa-fasa ini dikenali sebagai fasa pra-sintesis (G1), fasa sintesis DNA (S) dan fasa selepas sintesis (G2). Terdapat fasa lain seperti G0, di mana pada fasa ini sel-sel tidak mengambil bahagian dalam kitaran sel dan terhenti pada G1 dengan kandungan DNA nukleusnya sebanyak $2C$ ($1C$ adalah kuantiti DNA bagi genom haploid). Sel-sel mungkin berhenti beredar selepas satu tempoh tertentu pada fasa ini (Tolaro *et al.*, 1965). Pada umumnya, sel-sel pada G2 memasuki mitosis (M) dan selepas pembahagian, sel anak akan memasuki fasa G1. Istilah edaran sel atau kitaran sel sebenarnya merujuk kepada perjalanan sel-sel daripada satu pembahagian mitosis kepada pembahagian mitosis berikutnya dengan dimulai sel-sel berada pada M, kemudian beredar kepada S, G2 dan berbalik kepada M semula. Fasa G1 dan G2 adalah perantara di antara peristiwa yang lebih jelas iaitu mitosis dan sintesis DNA. Proses mitosis mengandungi bukti yang menakjubkan tentang pembahagian sama rata bahan-bahan genetik kepada dua bahagian. Malah, mitosis adalah fasa yang paling difahami dalam kitaran sel (Dyer, 1976).

Bagaimanapun, pada masa dahulu pernah dianggap bahawa pembahagian sel terdiri daripada 2 bahagian sahaja iaitu interfasa dan mitosis. Interfasa dikatakan sebagai fasa rehat sementara mitosis pula adalah tempoh di mana aktiviti sel aktif berlaku.

Penemuan yang mengubah salah faham di atas adalah selepas kewujudan fasa S diketahui. Fasa S adalah di mana DNA nukleus sel didapati mereplikasi dan menjadi bahan penting untuk proses mitosis. Duplikasi DNA nukleus pada tempoh di antara kelahiran sel dengan pembahagian (fasa S) adalah pusat kepada edaran sel. Apabila sel-sel diploid mula memasuki fasa S, mereka mempunyai kandungan DNA $2C$ dan selepas sempurna fasa S, kandungan DNA menjadi $4C$. Petunjuk yang membuktikan bahawa sel-sel menjalani sintesis DNA boleh dilakukan dengan membekalkan bahan radioaktif biasanya metil- $3\{H\}$ -tiamidin melalui teknik autoradiografi (Yeoman dan Aitchison, 1976).

Sel-sel eukariotik menyempurnakan kebanyakan daripada masa hidupnya pada peringkat interfasa dan sebahagian kecil lagi dengan mitosis dan sitokinesis. Namun begitu, ada beberapa sel pula yang pantas membahagi dan melalui interfasa pada masa yang singkat. Keupayaan untuk mengawal bila berlakunya pembahagian sel mempengaruhi perkembangan sesuatu organisma. Pembahagian sel yang tidak terkawal berkemampuan mencetus pembentukan barah (Levine *et al*, 1991). Pada tumbuhan, pembahagian sel adalah aspek penentu kepada perkembangan. Justeru itu, kemampuan untuk mengawal pembahagian sel tumbuhan mampu meningkatkan peluang-peluang untuk memanipulasikan perkembangan *in vivo* dan *in vitro*. Setiap percubaan untuk mengawal pembahagian sel mesti mengambil kira edaran sel yang terdiri daripada G1, S, G2 dan mitosis (Quastler dan Sherman, 1959). Kajian tentang edaran sel yang dibuktikan dengan analisa biokimia dan genetik membolehkan kaitan

hubungan edaran sel dengan pembahagian sel pada meristem tumbuhan *in vivo* dan *in vitro* dilakukan.

Banyak kajian tentang pengawalan edaran sel telah dilakukan ke atas yis, serangga dan amfibia serta pengetahuan tentang titik kawalan molekul bagi edaran sel tumbuhan telahpun diketahui. Karp (1991) menyatakan bahawa kawalan edaran sel merupakan satu daripada faktor utama yang mungkin mempengaruhi variasi somaklonal dan kestabilan sitologi bagi edaran sel tumbuhan *in vitro*.

Sel-sel tumbuhan didapati sensitif kepada tekanan apabila dipindahkan kepada media *in vitro*. Contohnya, dalam tempoh beberapa jam selepas dipindahkan ke media Murashige dan Skoog (MS), sel-sel *Vicia faba* didapati mengembang tetapi saiz nukleusnya tidak berubah dan banyak sel-sel menjadi poliploid. Poliploidi berlaku pada eksplan akar yang menunjukkan potensi organogenesis yang lemah tetapi bagi eksplan embrio, sel-sel menunjukkan respons organogenesis yang lebih baik (Taha dan Francis, 1990). Secara umumnya tahap poliploidi yang ditunjukkan oleh eksplan di dalam kultur dan keupayaannya untuk meregenerasi adalah sukar diterangkan. Beberapa spesies di dapati mampu bertoleransi dengan mixoploidi di dalam kultur dan terus menunjukkan regenerasi, manakala ada juga yang sangat 'recalcitrant' walaupun kultur tidak menunjukkan mixoploidi (*Cocos nucifera*) (Jesty dan Francis, 1991).

Kajian edaran sel selalunya menggunakan yis *Saccharomyces cerevisiae* dan *S. pombe*. Di dalam yis-yis ini, sejenis gen iaitu cdc gen (gen 'cell division cycle') telah dikenalpasti. Gen cdc2 bagi *S. pombe* dan homolognya CDC28 dalam *S. cerevisiae* didapati merupakan gen-gen yang terlibat di dalam edaran sel. cdc 2 berfungsi pada akhir G1 dan akhir G2. CDC28 berfungsi pada akhir G1. John *et al.*, (1989) telah mencadangkan bahawa titik kawalan penting bagi tindakan edaran sel melalui produk gen cdc2, p34^{cdc2} terletak pada akhir G1 dan akhir G2. cdc2 mengkodkan protein kinase (p34^{cdc2}) 34kDa yang berfungsi pada titik perubahan fasa G2 kepada fasa M dan fasa G1 kepada fasa S pada kitaran sel. cdc2 kinase digerakkan oleh fosfatase yang dikodkan oleh cdc25, dan dihentikan oleh protein kinase yang dikodkan oleh wee1. p34 mesti bergabung dengan protein siklin pada akhir G2 untuk membentuk faktor penggalak pematangan ('maturation promoting factor', MPF) sebelum menjalani aktiviti protein kinase (Lohka *et al.*, 1988). MPF juga kadang kala dipanggil faktor penggalak mitosis. Siklin telah ditemui pertama kali sebagai sekumpulan protein yang bertambah kepekataannya semasa edaran sel, tetapi didegradasi semasa mitosis (Rosenthal *et al.*, 1980; Evans dan Sharp, 1983). Pada tumbuhan, homolog kepada p34^{cdc2} telah dikenalpasti pada kekacang (pea), gandum, *Arabidopsis*, alfalfa, jagung dan *Chlamydomonas*. Pokok tembakau transgenik dapat mengungkap gen cdc25 yang mengakibatkan pelbagai gangguan terhadap perkembangan pokok tersebut berbanding tumbuhan liarnya. Pokok transgenik ini menunjukkan 'pocketing' daun, pembungaan awal, bunga tanpa petal dan lain-lain (Bell *et al.*, 1993). Saiz sel-sel meristem akar sekundernya juga didapati lebih kecil.

Kesan ke atas saiz dan perkembangan ini menunjukkan cdc25 boleh mengubah kitaran sel tumbuhan (Francis dan Halford, 1995).

Parameter-parameter saiz sel dan nukleus telah banyak dikaji ke atas akar tumbuhan peringkat tinggi (Lyndon 1967; Rasch *et al.*, 1967; Olszewska *et al.*, 1984). Bagaimanapun tidak banyak kajian bagi parameter ini dibuat bagi tumbuhan dalam sistem kultur. Sel-sel tumbuhan dalam kultur biasanya menjalani edaran yang panjang dan sel-sel kalus biasanya menunjukkan purata masa penggandaan sel yang lebih panjang (Bayliss, 1985). Biasanya G1 adalah fasa terpanjang bagi edaran sel-sel ini dan pertambahan ini mungkin berkait dengan pertambahan isipadu sel berbanding sel-sel meristem tumbuhan (Gould, 1984).

Taha dan Francis (1991) mendapati bahawa luas sel dan nukleus *Vicia faba* bagi sel-sel kalus adalah lebih kecil berbanding sel-sel meristem akar. Pengecilan ini mungkin berkaitan dengan pembentukan akar sekunder. Corak perubahan tertentu yang berlaku pada sel tidak semestinya diikuti oleh corak perubahan yang sama bagi nukleus. Mereka mencadangkan bahawa sel dan nukleus adalah bebas untuk berubah dan tidak bergantung antara satu sama lain apabila sel-sel dipindahkan dari keadaan *in vivo* kepada *in vitro*.

Kaedah yang biasa digunakan untuk mengukur masa penggandaan sel (Cdt) ialah dengan mendedahkan tisu-tisu tumbuhan kepada kolkisin yang berkepekatan rendah dan kemudiannya mengira pengumpulan sel-sel metafasa selepas beberapa jam

tempoh pendedahan. Kaedah ini mudah digunakan dan ia mengukur tempoh masa penggandaan sel, iaitu masa yang diperlukan oleh populasi sel untuk menjadi dua kali lebih banyak daripada populasi asal. Semua sel diambil kira tanpa mengira sama ada sel-sel itu menjalani edaran sel atau tidak.

Masa penggandaan sel akan menjadi sama dengan tempoh edaran sel sekiranya semua sel-sel beredar. Dalam keadaan semulajadi, tidak semua sel mengambil bahagian dalam edaran sel. Hanya sebahagian sel tertentu sahaja yang beredar dikenali sebagai 'growth fraction'. Bagaimanapun, perlakuan kolkisin yang lama boleh menyebabkan pertambahan frekuensi mitosis abnormal di mana kromosom-kromosom metafasa kelihatan seperti melekit (Wang dan Phillips, 1984). Kolkisin juga merupakan bahan yang sangat beracun dan boleh memberi kesan bahaya kepada perjalanan sel. Kerana itu, kegunaannya selalu terbatas kepada tempoh masa yang singkat dan kepekatan yang rendah untuk menghindarkan kesan-kesan bahaya dadah ini ke atas metabolisme sel (Webster dan MacLeod, 1980). Namun begitu, kegunaan kolkisin untuk pengumpulan sel-sel pada peringkat metafasa membolehkan perbandingan pengiraan masa penggandaan sel bagi keseluruhan meristem dilakukan. Tambahan pula, daripada banyak bahan penyekat gelendung, kolkisin adalah satu daripada yang paling berkesan (Phillips, 1981).

Salah satu keganjilan dalam kromosom yang biasa didapati ialah poliploidi. Poliploidi merujuk kepada gandaan set kromosom. Contohnya, $2n$ menjadi $4n$, $8n$, $16n$ dan sebagainya. Keadaan ini berlaku melalui proses endomitosis (Geitler, 1939) di mana

pemisahan kromatid adik-beradik sel berlaku dalam membran nukleus tetapi tanpa pembentukan gelendung (Sunderland, 1973). Ini menyebabkan sel-sel tersebut mengandungi 4 set kromosom ($4n$) dengan kuantiti DNA adalah $8C$. Jika proses ini diulangi berkali-kali, set kromosom dan kuantiti DNA akan meningkat dan menjadi tetraploid, oktaploid dan sebagainya.

Menurut Nagl (1978), jika replikasi DNA berlaku berulang kali dan mitosis wujud di dalam membran nukleus tanpa pembentukan gelendung, bilangan kromosom mungkin meningkat dan ini mewujudkan endopolipoidi. Walau bagaimanapun, jika kromosom direplikasi tanpa proses seperti mitosis untuk membolehkan kromatid adik-beradik berpisah, proses endoreduplikasi akan terjadi. Apabila ini terjadi, ia akan menghasilkan politen atau kromosom gergasi. Dalam kebanyakan spesies tumbuhan, tisu-tisu yang telah terbeza secara *in vivo* selalunya mengandungi nukleus endoreduplikasi (D'Amato, 1977). Misalnya, sel suspensor yang terbentuk ketika embriogenesis *Phaseolus vulgaris* dan *P.coccineus* telah melalui replikasi sehingga 12 kali sehingga membentuk kromosom politen (Nagl, 1974).

Di dalam kawasan sekitar meristem akar, nukleus sel-sel meristem selalunya mengandungi bilangan kromosom di dalam keadaan diploid ($2n$). Di kawasan ini, pembahagian sel berlaku dengan kerap. Lorz (1937) telah mengkaji taburan sel-sel poliploid di sepanjang akar *Spinacia* dan mendapati bahawa terdapat peningkatan progresif bilangan kromosom daripada sel-sel diploid pada bahagian meristem akar ke arah sel-sel yang telah membeza. Malah, pada turutan linear daripada bahagian

meristem ke bahagian pembezaan, Lorz mendapati sel-sel diploid (bilangan kromosom $2n$), sel tetraploid ($4n$), sel oktaploid ($8n$) dan seterusnya. Geitler (1939) menggunakan istilah endomitosis untuk menggambarkan mekanisme penggandaan kromosom di mana menurut beliau, penggandaan muncul semasa interfasa. Berger (1941) juga turut mencadangkan bahawa kromosom berganda semasa peringkat interfasa.

Poliploid juga terjadi pada sel-sel yang bukan meristematik yang telah mengalami pembezaan seperti sel-sel empulur, sel akar rerambut dalam *Elodea* (Dosier dan Riopel, 1978), sel nodul akar kekacang (Wipf dan Cooper, 1940) dan tisu kotiledon kacang tanah (Dhillon dan Mikshe, 1982). Namun begitu, perisikel, prokambium dan kambium adalah diploid (D'Amato, 1977). Bagi sesetengah spesies, proses endomitosis didapati berlaku secara spontan. Menurut Partanen (1963), endopoliploidi boleh dijumpai dalam kebanyakan tisu tumbuhan. Kehadiran sel-sel pada tahap ploidi yang berbeza di dalam tisu-tisu somatik dikenali sebagai polisomati. Polisomati boleh dijumpai dalam hipokotil, radikel, akar sekunder muda, daun-daun yang belum matang, tunas bunga dan ruas batang *Cucumis sativus* (Gillisen *et al.*, 1993).

Di dalam sesetengah tumbuhan, meristem apikal dan tisu-tisu yang telah dibezakan juga mengandungi bilangan kromosom aneuploid. Ini dikenali sebagai aneusomati. Aneuploid adalah penambahan atau pengurangan yang kurang daripada seluruh set haploid kromosom. Spesies tumbuhan yang menunjukkan aneuploidi termasuklah

Hymenocallis palathinum, tebu dan klon autotetraploid *Ribes nigrum* (D'Amato, 1985). Aneusomati berpunca daripada dua proses yang berbeza iaitu penyusunan dua gelendung mitosis yang terpisah di dalam sel uninuklear dengan bilangan kromosom yang berkurangan atau berpunca ketika pembentukan embrio di dalam biji benih yang sedang berkembang dengan gelendung berketub yang normal. Aneusomati tidak memberi kesan terhadap genotip sesuatu tumbuhan.

Struktur kromosom juga boleh berubah semasa pembezaan tisu-tisu yang bukan dalam fasa pembahagian. D'Amato (1952) menyatakan bahawa spesies tumbuhan yang menunjukkan aberasi di dalam tisu-tisu pembezaan juga boleh mengalami aberasi kromosom pada meristem apikal. D'Amato (1952) turut merumuskan data-data yang berhubung dengan taburan sel-sel poliploid pada tisu-tisu tertentu. Bahagian hujung akar dicirikan sebagai diploid, walaupun sel-sel poliploid juga didapati berdekatan dengan bahagian meristem ini. Secara amnya, keadaan poliploid dikaitkan dengan pertambahan usia dan pembezaan. Analisa kimia DNA akar menunjukkan bahawa terdapat penggandaan kandungan DNA per sel daripada bahagian meristem ke bahagian sel-sel mula membeza (Holmes *et al.*, 1955; Jensen dan Kavaljian, 1958a). Penggandaan DNA ini disebabkan oleh poliploidi.

Konsep teoretikal kultur sel telah digambarkan oleh ahli botani Jerman, Gottlieb Haberlandt pada tahun 1902. Beliau menjelaskan bahawa apabila beberapa kesukaran dapat dihindarkan, teknik kultivasi sel tumbuhan yang telah diasingkan di dalam larutan nutrien boleh dilakukan. Haberlandt menjalankan kajian ke atas sel-sel palisad

Lamium purpureum, *Pulmonaris* dan *Urtica*, rerambut pada stamen *Tradescantia* dan banyak lagi (Vasil, 1983).

Mikropropagasi adalah propagasi tumbuhan yang sama seperti induknya ('true-to-type') bagi genotip-genotip terpilih menggunakan teknik *in vitro*. Selalunya, mikropropagasi ini disertai dengan penghasilan beasr-besaran pada nilai yang kompetitif. Murashige (1974a, b) telah mencadangkan bahawa terdapat tiga peringkat mikropropagasi tumbuhan. Terdapat lima peringkat kritikal untuk mikropropagasi yang berjaya. Peringkat 0 yang dikenali sebagai peringkat penyediaan (Debergh dan Maene, 1981) adalah penting untuk perkembangan mikropropagasi yang boleh diulangi. Peringkat ini dikenali sebagai penawar untuk masalah kontaminasi. Penanaman tumbuhan induk di bawah keadaan yang lebih bersih boleh mengurangkan masalah kontaminasi ini, terutamanya yang berkaitan dengan kulat (Debergh dan Maene, 1981). Kesan daripada peringkat 0 ini tidak hanya terhad kepada keadaan kebersihan eksplan sahaja tetapi juga mempengaruhi kadar kebolehidupan tumbuhan. Kepentingan keadaan persekitaran untuk eksplan yang berkualiti telah didemonstrasikan pada banyak tumbuhan tropika. Di Malaysia contohnya, Senawi (1985) cuma berjaya mendapatkan eksplan reaktif *Theobroma cacao* (koko) selepas induknya ditanam di bawah keadaan rumah hijau.

Matlamat peringkat pertama pula adalah untuk mendapatkan kultur aksenik. Kejayaan peringkat permulaan kultur ini bergantung kepada sumber eksplan, usia tumbuhan stok, usia fisiologi eksplan, peringkat perkembangannya, saiz dan bahagian eksplan

yang dipilih (Fanclet *et al.*, 1987). Pada peringkat kedua iaitu peringkat penggandaan kultur, didapati kultur mampu menyediakan pucuk untuk turutan propagasi dan bahan-bahan yang diperlukan untuk mengekalkan sumber stok. Peringkat ketiga lebih dikenali sebagai peringkat pemanjangan dan penghasilan akar atau peringkat perkembangan. Asasnya, cuma dua pilihan dalam peringkat pertama iaitu sama ada untuk menghasilkan plantlet ataupun keratan. Bilangan pucuk, panjang pucuk, bilangan pucuk berakar, bilangan akar dan panjang akar adalah di antara parameter yang digunakan untuk menentukan keberkesanan perlakuan dalam peringkat ini.

Peringkat keempat lebih dikenali sebagai peringkat pemindahan kepada keadaan rumah hijau. Organ yang diinisiasikan di dalam kultur ditentukan oleh persekitaran kultur dan mempunyai ciri-ciri yang sama seperti dalam keadaan *in vitro* selepas dipindahkan ke rumah hijau. Ciri-ciri ini beransur-ansur berubah kepada normal semasa jangka masa aklimatisasi dilakukan.

Tumbuhan pertama yang berjaya dipropagasi secara besar-besaran dengan teknik kultur tisu adalah merupakan tumbuhan hiasan (Morel, 1965). Kebanyakan kajian-kajian awal yang berkaitan pengalaman komersil diperolehi daripada bunga keratan seperti *Cymbidium*, *Dianthus* dan *Chrysanthemum*. Ada prognosis yang mengatakan pada akhir dekad ini, daripada 3000 spesies tumbuhan yang dimikropropagasikan, majoriti daripadanya adalah tumbuhan hiasan.

Organ tumbuhan yang dikultur terdiri daripada dua jenis iaitu organ 'determinat' dan 'indeterminat'. Organ determinat adalah tisu yang telahpun membentuk struktur khas yang mempunyai saiz dan bentuk yang khusus seperti daun, bunga dan buah. Organ indeterminat pula adalah tisu yang belum membeza dan tidak terhad pertumbuhannya seperti meristem apeks daripada akar dan pucuk. Beberapa jenis kultur organ termasuklah kultur meristem atau kultur hujung pucuk, kultur nod tunggal (kultur satu atau dua bahagian nod dengan tunas), kultur embrio dan kultur hujung akar.

Penghasilan bentuk atau organisasi baru yang tidak wujud pada awalnya dinamakan morfogenesis atau organogenesis. Pembentukan struktur-struktur ini dapat dilakukan secara *de novo*. Proses terbentuknya pucuk (kaulogenesis) dan akar (rizogenesis) dapat diaruh secara berasingan. Embrio yang dihasilkan dalam kultur tisu vegetatif dinamakan embrio somatik atau embriod dan proses pembentukan struktur ini dinamakan embriogenesis.

Terdapat dua kaedah morfogenesis iaitu organogenesis secara langsung dan tidak langsung. Organogenesis secara langsung berlaku apabila cebisan-cebisan besar tumbuhan dipindahkan ke dalam media nutrien, pucuk, akar dan embrio somatik dapat terbentuk tanpa terbentuknya tisu kalus terlebih dahulu. Organogenesis secara tidak langsung pula membentuk organ-organ daripada tisu kalus (Teo, 1992).

Kalus biasanya lebih berupaya untuk meregenerasikan akar 'adventitious' berbanding pucuk 'adventitious' (Thomas dan Davey, 1975). Pembentukan akar biasanya berlaku

dalam media yang secara relatifnya berkepekatan auksin yang lebih tinggi dan sitokinin yang rendah. Pembentukan primordia akar selalunya memerlukan kepekatan auksin yang lebih tinggi berbanding keperluan untuk meneruskan tumbesaran akarnya itu.

Bagi carnation (*Dianthus caryophyllus*), kultur menggunakan meristem telah dijalankan untuk penggandaan *in vitro* (Leshem, 1986) dan penyingkiran virus (Baker dan Phillips, 1962). Petru dan Landa (1974) berjaya melakukan organogenesis *Dianthus caryophyllus* cv Grenadin secara *in vitro* daripada eksplan hipokotil dan meristem hujung. Pembentukan pucuk-pucuk berganda juga telah didapati daripada eksplan petal, tetapi vitrifikasi pucuk dan pembungaan pra-matang menjadi masalah (Kakehi, 1979; Gimelli *et al.*, 1984). Pucuk-pucuk berganda juga telah berjaya diregenerasikan daripada eksplan batang (Lubomski dan Jerzy, 1989), ovul (Demmink *et al.*, 1987), anter (Villabos, 1981), hujung pucuk (Johnson, 1982) dan tunas sisi (Miller *et al.*, 1991). Transformasi genetik yang telah berjaya diaplikasikan kepada beberapa spesies tumbuhan tetapi masih di peringkat kajian bagi spesies carnation ini (Mol *et al.*, 1991). Teknik kultur sel dan tisu adalah instrumen untuk pembiakan dan penghasilan tumbuhan varieti baru (Stimart, 1986; Evans, 1989). Kultur tisu carnation yang digunakan sekarang khusus untuk mikropropagasi dan penyingkiran virus melalui kultur hujung pucuk (Earle dan Langhans, 1975).

Nisbah auksin:sitokinin adalah satu daripada faktor-faktor yang mempengaruhi kesan corak morfogenesis seperti pembentukan bunga, tunas dan pembentukan akar (Tran

Thanh Van *et al.*, 1974). Perkembangan teknik kultur tisú berkait rapat dengan penemuan dan percirian pengawalatur tumbesaran iaitu auksin dan sitokinin (Skoog dan Miller, 1957). Hormon-hormon ini berperanan membolehkan pembahagian dan perkembangan sel apabila tidak berlaku pembezaan sel di dalam kultur. Jenis sitokinin yang digunakan mempunyai kesan penting ke atas regenerasi pucuk. Hormon BAP didapati lebih efektif berbanding kinetin untuk menggalakkan pembentukan pucuk bagi tumbuhan dikot (Agrawal *et al.*, 1989) dan gimnosperma (Patel dan Thorpe, 1986). Thidiazuron (TDZ) pula lebih efektif berbanding BAP untuk menggalakkan pembentukan pucuk daripada eksplan petal carnation. TDZ dilaporkan mempunyai aktiviti sitokinin (Mok *et al.*, 1982) dan menambah frekuensi regenerasi pucuk bagi beberapa species tumbuhan seperti ros (Fasolo *et al.*, 1989; Fiola *et al.*, 1990).

Pendedahan kepada gelap didapati boleh menambah regenerasi pucuk berganda bagi eksplan daun carnation, seperti juga yang berlaku pada kultivar epal (Fasolo *et al.*, 1989). Kepekatan agar yang digunakan turut mempengaruhi proliferasi. Pucuk yang didapati daripada kultur media cecair yang diinkubasikan di dalam keadaan gelap atau bercahaya seringkali menghasilkan tumbuhan 'vitreous'. Namun begitu, agar berkepekatan 5.5g/l adalah cukup untuk mengelakkan vitrifikasi dan menghasilkan pucuk-pucuk berakar (Deberg dan Maene, 1984).

Tumbuhan herba dan berkayu yang dipropagasikan secara *in vitro* sering diserang oleh kehadiran pelbagai faktor-faktor yang menyebabkan ketidaktentuan metabolik

dan morfologi kultur. Salah satu daripadanya adalah vitrifikasi, atau kadang kala disebut hiperhidrasi, translusensi, sukulensi dan 'glassiness'. Walaupun istilah vitrifikasi telah disalahgunakan kerana ia merujuk kepada keadaan fizikal dan bukannya proses biologiikal, tetapi ia paling kerap digunakan untuk menunjukkan perubahan pada daun yang menimbulkan ciri 'berkaca'. Ciri ini dapat dilihat dengan jelas pada daun carnation *in vitro*. Menurut Debergh dan Maene (1984), kekacauan ini yang sering dimanifestasi pada daun, memberi kesan kepada dua proses utama yang berlaku pada daun iaitu fotosintesis dan pertukaran gas (CO_2 , wap air). Keadaan ini juga kadang-kadang berlaku pada batang dan akar tumbuhan *in vitro*. Ia boleh menghalang tumbuhan *in vitro* ini meneruskan kehidupan dalam keadaan *ex-vitro* (Ziv, 1991).

Keperluan penting untuk proliferasi tumbuhan *in vitro* iaitu kelembapan yang tinggi, faktor nutrisi yang mencukupi, mineral dan karbohidrat, pengawalatur tumbesaran tumbuhan pada tahap yang tinggi dan kekurangan keamatan cahaya didapati merupakan faktor-faktor utama yang mengalakkan pembentukan pucuk vitrifikasi (Ziv, 1986; Gasper *et al.*, 1986). Debergh (1987) menunjukkan bahawa kelembapan bandingan dan potensi air adalah kunci utama terlibat dalam keganjilan morfogenesis *in vitro* seperti vitrifikasi ini. Ujian mikroskopik daun-daun vitrifikasi ini mendapati bahawa ia menghasilkan sama ada tisu palisad yang sangat nipis atau tiada langsung. Kebanyakan mesofil tidak tersusun secara sempurna dengan sel-sel perenkima berspan yang kaya dengan ruang antara sel. Pada daun carnation, pertambahan ruang antara sel ini adalah disebabkan oleh ekstra protoplastik air (Kevers dan Gaspar,

1986). Dalam pucuk carnation yang dikultur di dalam media cecair, kloroplasnya didapati mengandungi butiran kanji yang besar (Ziv dan Ariel, 1988) dan kandungan klorofil yang lebih rendah berbanding daun normal (Ziv *et al.*, 1983). Kajian histokimia ke atas sel pengawal daun carnation yang mengalami vitrifikasi mendapati terdapatnya kutin, pektin dan selulos yang rendah (Ariel, 1987; Ziv dan Ariel, 1988, 1990), saluran prokambial turut tidak didapati dan berkas vaskular diorganisasi secara kurang sempurna (Leshem, 1983a). Penambahan agar dan sukrosa didapati dapat mengurangkan vitrifikasi (Ziv *et al.*, 1983).

Kebanyakan species *Dianthus* (carnation) ditanam sebagai tumbuhan hiasan kebun, bunga keratan atau sebagai tumbuhan pasu. Spesies yang biasa ditanam secara meluas adalah *D. barbatus* L. (Sweet William), *D. plumarius* (pink) dan hibrid-hibrid diantaranya serta *D. caryophyllus* (carnation).

Genus *Dianthus* adalah ahli daripada famili Caryophyllaceae yang terdiri daripada lebih kurang 75 genera dan 2000 spesies (Wagner *et al.*, 1990). Kebanyakan tumbuhan di dalam famili ini adalah pokok jenis herba annual atau perenial atau pokok renik kecil. Daunnya pada kedudukan setentang, kadang kala berstipul dan bengkok pada bahagian buku serta bercabang dikotomus. Carnation (*D. caryophyllus*) (Plat 1, m.s. 29) adalah tumbuhan perenial separa-keras dengan batang bercabang, daun linear dan 'glaucous', bertentang dan pasangan 'decussate'. Setiap batang membentuk bunga di hujung (terminal) solitari atau dalam jambak simos-panikal.

Seperti tumbuhan bunga keratan yang jambak bunganya berbentuk simos (contohnya ros dan kekwa), pucuk yang berbunga boleh dipasarkan dalam dua bentuk sama ada kudup bunga yang terbentuk pada pucuk sisi pendek yang terbit daripada aksil atas daun yang dibuang dan ditinggalkan satu bunga terminal yang besar di atas batang berdaun yang panjang (jenis standard) atau kudup bunga terminal dibuang pada peringkat awal untuk menggalakkan lebih banyak bunga-bunga sisi menghasilkan batang-batang berbunga berganda (jenis spray atau 'miniature'). Bunga carnation biasanya protandrus, hermafrodit atau uniseksual dan aktinomorfik. Kaliks terdiri daripada 5 sepal yang bercantum atau bebas, stamen 5+5 atau kurang, ovari superior yang terdiri daripada 2-5 karpel bercantum sekurang-kurangnya unilokular. Ovul sangat banyak dan biasanya kampilotropus. Dalam kebanyakan kes, bunga adalah obdiplostemonous. Buah biasanya berkapsul dan mengandungi banyak biji benih. Biji biasanya mempunyai perhiasan di permukaan, perisperma berkanji, keras dan jarang sekali lembut serta mempunyai endosperma sebenar.

Sama ada disebabkan oleh bau 'spicy clove' atau kualiti yang bertahan lama, carnation merupakan satu daripada bunga jualan yang terlaris sekarang. Carnation menjadi popular di Perancis pada lewat tahun 1500-an dan 1600-an. Ia popular pada masa itu disebabkan bau clove yang sangat semerbak. Carnation seterusnya menjadi popular di Amerika Syarikat dengan bantuan Anna Jarris, wanita yang menama dan mempopularkan Hari Ibu.

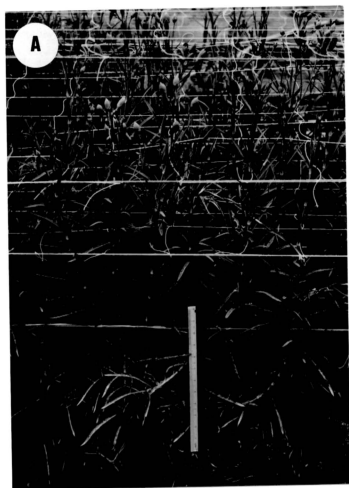
Carnation dikenali di Malaysia sebagai bunga teluki, turki atau bunga anyelir dengan beraneka warna seperti merah, merah jambu, kuning dan ungu. Perkataan carnation berasal daripada perkataan Greek iaitu 'coronation' yang bermaksud pertabalan. Mengikut sejarah, orang-orang Greek mengarang bunga carnation dalam bentuk mahkota dan kebanyakannya dikalungkan kepada para atlit mereka (Basemer, 1980). Theopratus telah menulis tentang *Dianthus* yang diterjemahkan dari bahasa Greek iaitu 'dios' yang bermaksud 'divine' (sangat cantik, indah), 'anthos' yang bermaksud 'flower' (bunga) dan 'caryophyllus' sebagai nama warisan untuk keharuman bunga carnation (Basemer, 1980).

Carnation memerlukan suhu sejuk ($9-10^{\circ}\text{C}$) dan keamatan cahaya yang tinggi untuk menghasilkan bunga yang berkualiti (Janick, 1963). Tanaman ini berasal dari kawasan berhawa dingin dan sederhana. Carnation biasanya berbunga pada musim panas (Bunt dan Cockshull, 1985). Carnation juga boleh hidup dan tumbuh di kawasan Khatulistiwa yang mempunyai altitud yang sesuai dan suhu udaranya rendah seperti di Colombia dan Kenya.

Di Malaysia, tanaman ini hidup subur dan berbunga dengan baik di Cameron Highlands dan Bukit Fraser (Ismail, 1993). Chopra *et al.*, (1956) mendapati bahawa di India, carnation tumbuh pada ketinggian 7000 kaki dari aras laut. Pokok carnation yang ditanam di rumah hijau mempunyai ketinggian di antara 30-46 sm (Buckley, 1977). Blake (1955) mengelaskan carnation sebagai tumbuhan kuantitatif hari

Plat 1

- A. Tumbuhan 'intact' *Dianthus caryophyllus* Linn. (carnation)
- B. Pelbagai warna carnation yang dikomersilkan sebagai bunga keratan yang popular.



Dua jenis bunga keratan yang penting iaitu *Dianthus caryophyllus* dan *Chrysanthemum morifolium* boleh dimikropropagasikan dengan mudah dengan kadar regenerasi yang tinggi. Setakat ini, pengeluaran lansung tumbuhan kultur tisul selalunya dianggap tidak ekonomik kerana tumbuhannya lebih mahal berbanding kaedah propagasi tradisional dan kebimbangan wujudnya variasi 'off-type' dan mutasi. Tambahan pula, pengeluaran keratan secara tradisional bagi spesies ini masih belum membahayakan dan kemudahan mendapatkan tumbuhan induk yang sihat didapati berguna untuk menambahkan kadar propagasi *in vivo* (Hakkaart dan Versluijs, 1983).

Satu program kajian telah dijalankan untuk menilai pengeluaran secara mikropropagasi dan keratan bagi kultivar-kultivar carnation. Kajian tersebut mendapati bahawa kos pengeluaran tumbuhan kultur tisul carnation lebih murah berbanding secara keratan dan dijamin boleh meningkatkan pengeluaran sehingga 30-40% (Debergh Zimmerman, 1991).

Di Malaysia, industri florikultur telahpun menjadi satu sektor yang cerah di bidang pertanian sejak kebelakangan ini. Walaupun sumbangan bidang pertanian merosot kepada 14% pada tahun 1993 berbanding 21% pada tahun 1988, sumbangan bidang florikultur kepada Keluaran Dalam Negara Kasar (KDNK) meningkat dari 0.02% kepada 0.04% pada 1993. Bunga-bunga keratan segar adalah produk utama dalam industri florikultur di Malaysia. Di antara bunga-bunga yang dikomersilkan termasuk orkid, kekwa, carnation dan ros. Bunga-bunga temperat ini ditanam di Cameron

Highlands, Pahang. Keadaan cuaca yang ideal di Cameron Highlands dengan kebanyakan ladang berada pada ketinggian 1,000 - 1,600m dari aras laut sesuai untuk penghasilan bunga temperat. Bunga-bunga yang popular di negara ini adalah ros, diikuti orkid, kekwa dan carnation. 45% daripada tujuan pembelian bunga di Malaysia adalah untuk menghias rumah, pejabat dan premis perniagaan, 39% untuk upacara perayaan seperti Tahun Baru Cina, Hari Valentine dan upacara keagamaan, 16% untuk pengebumian, perkahwinan dan lain-lain. Kajian kegemaran dan tabiat pembeli terhadap bunga segar di Semenanjung Malaysia (Jamil *et al.*, 1990) mendapati bahawa jenis bunga yang paling digemari ialah ros, carnation, kekwa dan orkid. Singapura adalah pasaran terbesar bagi bunga-bunga temperat dari Malaysia. Kira-kira 70% daripada bunga-bunga ini diimport oleh Singapura di mana carnation dan ros adalah dua jenis bunga yang paling popular di samping lily, iris dan tulip. Dianggarkan bahawa jumlah nilai eksport bunga telah mencapai RM 40 juta pada tahun 1993 berbanding RM 5.7 juta pada tahun 1986. Kebanyakan bunga ini dieksport ke Jepun, Korea Selatan, Taiwan, Hong Kong, Singapura, Australia dan New Zealand (The Sun Magazine, 1995).

Banyak kacukan yang telah dilakukan ke atas carnation dan beratus-ratus jenis kultivar telah diperolehi dengan pelbagai saiz dan warna, sehingga amat sukar untuk mengenal pasti spesies asalnya. Varieti carnation yang telah dihasilkan melalui pengacukan ini seperti kultivar 'Red Sim' dan 'White Sim' merupakan carnation yang paling terkenal (Janick, 1963).

Dua jenis penyekat virus HIV telah berjaya diasing dan ditulinkan daripada daun carnation. Protien DAP 30 dan 32 (protein *dianthus* anti-HIV, 30 dan 32Da) menyekat jangkitan HIV-1 dan replikasi pada dos tertentu dengan kesan toksisiti yang kecil pada sel sasaran. Aktiviti anti-HIV dalam DAP 30 dan DAP 32 dikatakan merupakan kompaun yang mungkin berguna seperti agen terapi dalam rawatan jangkitan HIV-1. Indeks terapi sebatian ini dalam peringkat 10^4 dicadangkan amat penting dalam rawatan AIDS. Tindakan anti-HIV bagi kompaun ini didapati berupaya bertindak ke atas beberapa peringkat edaran hidup virus, berkesan ke atas jangkitan dan replikasi virus (Sylvia *et al.*, 1991).

Dalam famili Caryophyllaceae, *Dianthus caryophyllus* didapati mempunyai nilai ekonomi yang tinggi, selain *D. barbatus* dan spesies *Dianthus* yang lain. Carnation juga merupakan di antara bunga yang paling penting dalam pasaran dunia sekarang selepas ros dan kekwa. Di samping itu, carnation merupakan di antara tumbuhan hiasan yang mempunyai nilai perubatan yang tinggi. Di Sepanyol dan Amerika Utara, bahagian bunga digunakan sebagai 'cardiotonic', 'diaphoretic', 'alexiterik' dan 'narvine'. Di China, tumbuhan ini digunakan sebagai ubat cacing 'vermifuge' (Chopra *et al.*, 1956). Dalam industri kosmetik, bahagian bunga carnation diekstrak untuk penghasilan minyak wangi yang bermutu tinggi.

Anak tumbuhan hasil kaedah kultur tisu biasanya sukar ditanam apabila dikeluarkan daripada bekas pengkulturan. Proses di mana tumbuhan ini menyesuaikan diri terhadap perubahan persekitaran dipanggil aklimatisasi. Proses penyesuaian ini perlu

kerana anak tumbuhan *in vitro* tidak sesuai ditanam dalam keadaan *in vivo* secara langsung. Plantlet *in vitro* akan diaklimatisasikan secara beransur-ansur kepada persekitaran di dalam rumah hijau ataupun di lapangan di mana teknik ini memerlukan perubahan kepada kelembapan bandingan yang lebih rendah, keamatan cahaya yang lebih tinggi, tumbesaran secara autotrofik dan persekitaran septik (Preece dan Sutter, 1991). Proses aklimatisasi ini boleh dimulakan semasa plantlet masih dalam keadaan *in vitro*. Apabila Sutter dan Langhans (1982) mendedahkan plantlet kobis kepada kelembapan bandingan yang rendah iaitu 35% dalam keadaan *in vitro*, pada mulanya tumbuhan kelihatan layu tetapi kemudiannya pulih semula. Lapisan lilin yang terbentuk pada daun-daun baru plantlet didapati sama seperti yang terdapat pada daun yang ditanam di rumah hijau.

Satu lagi kaedah aklimatisasi plantlet semasa masih dalam keadaan *in vitro* adalah dengan cara menanggalkan penutup vesel kultur untuk beberapa hari sebelum memindahkan tumbuhan ke tanah. Apabila vesel yang mengandungi plantlet camation dibuka tudungnya di dalam bilik yang mempunyai kelembapan bandingan di antara 50-70%, didapati ia meningkatkan pembentukan lilin epikutikular dan kadar kebolehidupannya bertambah daripada 70 kepada 90% (Ziv, 1986). Plantlet-plantlet ini kemudiannya dipindahkan ke dalam rumah hijau. Kaedah ini perlu dilakukan secara berperingkat kerana media yang mengandungi sukrosa senang menghadapi masalah kontaminasi. Tumbuhan didedahkan sedikit demi sedikit kepada persekitaran normal. Apabila plantlet dikeluarkan daripada vesel kultur, media beragar pada akarnya perlu dicuci kerana sukrosa dan nutrien-nutrien yang terdapat pada akar itu

boleh bertindak sebagai media yang berpotensi untuk pertumbuhan mikroorganisma pembawa penyakit (Dunstan, 1981; Pocock, 1983; Miller, 1983).

Disebabkan keadaan anatomi dan fisiologi plantlet yang dihasilkan secara *in vitro* tidak berkembang dengan baik, adalah penting untuk mengekalkan kelembapan bandingan pada beberapa hari pertama pemindahan. Beberapa kaedah seperti penggunaan alat 'mistifier', 'fogging' dan 'humidifier' digunakan untuk mengekalkan kelembapan udara. Plantlet juga boleh diletakkan di dalam bekas tertutup yang akan menahan wap air (Dunstan dan Turner, 1984).

Media pertumbuhan dan bekas yang digunakan oleh plantlet *in vitro* semasa pengakaran adalah penting untuk mendapatkan kebolehidupan yang baik untuk aklimatisasi. Penyekat tumbesaran atau perubahan mendadak nilai pH media boleh memberi kesan songsang kepada tumbesaran akar dan kejayaan penanaman (Jones, 1982; Mc Cown, 1986).

OBJEKTIF

Dianthus caryophyllus Linn. atau carnation adalah bunga keratan yang popular di Malaysia selepas ros dan kekwa (Jamil *et al.*, 1990). Kajian ke atas carnation cv. Grenadin yang menghasilkan bunga berwarna merah jambu, putih, kuning, merah dan merah tua dijalankan dengan tumpuan mendalam ke atas aspek kultur tisú dan sitologi. Walaupun kajian kultur tisú ke atas beberapa kultivar carnation telah banyak

dijalankan, seperti carnation cv. Scania (Nakano *et al.*, 1994), cv. G. J. Sim, (Engvild, 1972) dan sebagainya, namun kajian ke atas carnation cv. Grenadin tidak banyak diterokai. Kajian ini telah ditumpukan ke atas aspek kultur tisú tumbuhan ini seperti kebolehan regenerasi, respons dalam sistem *in vitro*, respons terhadap hormon dan lain-lain.

Dalam kajian kultur tisú, sumber eksplan yang berbeza iaitu batang, batang bernod, daun dan akar telah digunakan dan hasil eksperimen yang dilaporkan adalah mengenai keperluan kimia seperti jenis media asas, kepekatan hormon, pH dan sukrosa serta keperluan fizikal seperti faktor cahaya dan suhu ke atas potensi regenerasi pucuk berganda untuk dipropagasi secara besar-besaran. Pelbagai hormon telah digunakan iaitu NAA, IAA, 2,4-D, 2iP, Kinetin, BAP dan Zeatin di atas media asas Murashige dan Skoog (1962) serta Nistch dan Nistch (1969) untuk mendapatkan propagasi pesat pucuk-pucuk baru. Kejayaan propagasi pesat carnation ini secara *in vitro* dan kebolehidupannya selepas diaklimatisasi *ex-vitro* diharapkan dapat meluas dan mengembangkan potensi carnation yang selama ini hanya ditanam secara konvensional di negara kita iaitu dengan menggunakan keratan batang dan biji benih.

Meskipun pendekatan dari aspek kultur tisú telah banyak digunakan oleh penyelidik dari luar negara, namun kajian ini lebih banyak memberi tumpuan ke atas aspek sitologi dalam sistem *in vivo* dan *in vitro*. Perbandingan kelakuan sel carnation yang ditanam secara *in vivo* dan *in vitro* telah dijalankan dengan lebih mendalam dan tiada kajian seumpama ini telah dilakukan ke atas carnation cv. Grenadin ini. Kelakuan sel

carnation yang dikultur secara *in vitro* mungkin boleh menjadi penentu kepada potensi regenerasi yang ditunjukkan oleh eksplan yang dikultur (D'Amato, 1977). Status tumbuhan yang diregenerasikan secara *in vitro* juga dapat ditentukan sama ada ia serupa dengan induk ('true-to-type') ataupun telah mengalami variasi somaklon.

Parameter sitologi yang diukur dalam kajian ini ialah nilai purata indeks mitosis, bilangan kromosom, luas sel dan nukleus, tahap ploidi dan masa penggandaan sel. Parameter-parameter ini berpotensi untuk memberi gambaran yang jelas mengenai status aktiviti sel yang berlaku di dalam sistem kultur tisu untuk dibandingkan dengan aktiviti sel dalam tumbuhan 'intact'. Sebarang perubahan yang mungkin muncul pada peringkat morfologi, mungkin boleh dijangkakan apabila analisa mengenai status nukleus sel-sel *in vivo* dan *in vitro* telah dijalankan. Ini memberi peluang kepada kita untuk mengesan dengan lebih cepat sekiranya wujud sebarang variasi. Kelakuan sel juga boleh dihubungkan dengan keupayaan regenerasi.