

BAB 3 : KAJIAN SITOLOGI KE ATAS AKAR PRIMER *Dianthus caryophyllus* Linn. CV. GRENADIN YANG DITANAM SECARA *IN VIVO*

3.1 PENGENALAN

Meristem akar dan pucuk adalah struktur yang diorganisasikan dengan kompleks. Sel-selnya mensintesis protoplasma baru, membesar dan membahagi. Tumbesaran sel dan pembahagiannya adalah proses yang menakrifkan istilah meristem. Meristem akar bukanlah terdiri daripada populasi sel yang tunggal dan homogenous (Jensen dan Kavaljian, 1958; Clowes, 1961). Bagi meristem *Vicia faba* contohnya, sel-sel meristemnya berbeza dari segi kebolehan proliferasi, tempoh edaran sel, saiz nukleus, saiz dan bentuk kromosom. Perbezaan tempoh edaran sel pada dasarnya adalah berhubungkait dengan kehadiran satu sub-populasi sel yang membahagi dengan perlahan sedangkan sub-populasi yang lain pula membahagi secara aktif (Howard dan Dewey, 1960; Clowes, 1961; Murin, 1966; Rasch *et al.*, 1967). Webster dan Davidson (1968) mendapati bahawa di samping sel-sel di pusat kuisen yang edaran selnya adalah panjang, meristem itu sendiri terdiri daripada 3 jenis sel iaitu sel-sel proliferasi dengan purata tempoh edaran selnya kira-kira 14 jam yang dikenali sebagai sel yang aktif membahagi, sel-sel proliferasi yang mana tempoh edaran sel sekurang-kurangnya 30 jam yang dikenali sebagai sel yang membahagi dengan perlahan dan sel-sel yang tidak proliferasi. Di dalam meristem akar primer *Vicia*

faba misalnya, didapati bahawa 41% daripada sel-selnya aktif membahagi sementara 19% lagi membahagi dengan perlahan (MacLeod, 1971).

Dalam kajian ini, kelakuan sel akar primer *Dianthus caryophyllus* dianggap sebagai kelakuan sitologi piawai dalam keadaan *in vivo* di mana jika sebarang perubahan persekitaran berlaku, ia dapat dibandingkan dengan aktiviti-aktiviti sel pada keadaan piawai ini. Pada asasnya, tujuan kajian ini adalah untuk merekodkan nilai indeks mitosis, bilangan kromosom, keadaan DNA nukleus, luas sel, luas nukleus dan masa penggandaan sel bagi akar primer tumbuhan 'intact' carnation. Data yang diperolehi daripada kaedah *in vivo* ini digunakan sebagai data kawalan atau 'background data' di mana data daripada segmen akar kultur *in vitro* akan dibandingkan. Dengan kata lain, kaedah penentuan parameter-parameter *in vivo* ini akan digunakan pula untuk mengesan perubahan aktiviti sel apabila segmen akar ini dipindahkan ke media kultur tisu.

Indeks Mitosis (MI)

Tahap dan kadar pembahagian sel adalah berbeza pada bahagian-bahagian meristem yang berbeza. Salah satu cara termudah untuk membandingkan kadar pembahagian sel adalah dengan mengira peratus mitosis nukleus (MI). Walaupun begitu, nilai MI ini hanyalah merupakan hubungan di antara tempoh mitosis dengan interfasa dan mungkin boleh mengelirukan. Contohnya, jika kadar pembahagian sel adalah rendah

dan ia disebabkan oleh masa yang digunakan oleh nukleus semasa mitosis juga rendah, maka tentulah akhirnya mengubah tempoh edaran mitosis. MI didapati tidak memberikan apa-apa petunjuk untuk menentukan panjang tempoh edaran mitosis kerana tiada pengiraan masa dimasukkan di dalam pengiraannya.

Dalam kajian ini, indeks mitosis bagi sel-sel akar yang ditanam secara *in vivo* akan bertindak sebagai data kawalan untuk perbandingan dengan data lain yang diperolehi daripada segmen akar yang dikultur secara *in vitro*. Indeks mitosis ditakrifkan sebagai bandingan kadar pembahagian sel semasa pemerhatian dibuat ke atas meristem yang tidak 'synchronous'. Kaedah ini membolehkan perubahan terhadap pembahagian mitosis dikesan apabila akar primer carnation ini dipindahkan ke media kultur tisu.

Bilangan Kromosom

Bilangan kromosom adalah ciri biologikal yang jelas untuk penentuan sesuatu spesies. Biasanya, variasi bilangan kromosom boleh menyebabkan perubahan ciri morfologi atau fisiologinya. Bilangan kromosom tumbuhan 'intact' dianggap sebagai data rujukan apabila perbandingan dibuat dengan tisu yang dikenakan dengan sesuatu perlakuan. Selalunya, tumbuhan 'intact' mempunyai bilangan kromosom diploid, iaitu $2n$ kromosom. Bagi genus *Dianthus*, Carolin (1957) mendapati bahawa bilangan kromosomnya menunjukkan ciri poliploidi mudah dengan bilangan asas $x = 15$. Menurut beliau, salah satu sebab mengapa genus *Dianthus* susah untuk dianalisa

secara taksonomi adalah kerana kehadiran hibrid-hibrid yang masih kabur sempadan sistematiknya. Kromosom *Dianthus* juga adalah sangat kecil dan penganalisan karyotipnya juga adalah rumit. Poliploidi daripada spesies *Dianthus* yang sama taksonominya tidaklah mempunyai kromosom yang lebih kecil daripada diploid (Darlington, 1937) ataupun spesies-spesies poliploid *Dianthus* tidaklah mempunyai kromosom yang lebih kecil daripada spesies-spesies diploid.

Penentuan Purata Luas Sel dan Luas Nukleus

Kajian luas sel dan luas nukleus telahpun dijalankan secara meluas ke atas meristem akar tumbuhan peringkat tinggi (Lyndon, 1967; Thomas dan Davidson, 1983). Dalam eksperimen ini, ukuran purata luas sel dan luas nukleus bagi 2 mm apeks akar primer *Dianthus caryophyllus* Linn. cv. Grenadin dilakukan. Ianya untuk menentukan sama ada wujud korelasi di antara luas sel dan luas nukleus kedua parameter itu iaitu sama ada ianya bebas untuk berubah atau saling bergantung di antara satu sama lain. Ada pendapat yang mencadangkan bahawa saiz sel merupakan elemen penting untuk mengawal proliferasi sel, bukan hanya bagi tumbuhan peringkat tinggi (Ivanov, 1971) malah bagi haiwan (Baserga, 1984), yis (Fantes dan Nurse, 1977) dan bakteria (Nanhing *et al.*, 1982). Model-model yang menarik telah dibentuk menunjukkan kapasiti proliferasi sel adalah bergantung kepada saiznya pada posisi edaran sel yang spesifik (Cooper, 1982; Nurse, 1980; Tyson, 1983 dan Wheals, 1982).

Untuk penentuan luas sel dan luas nukleus, cuma sel pada peringkat profasa sahaja yang dikira. Ini adalah kerana, cuma pada peringkat profasa sahaja sampul nukleus boleh dilihat dengan jelas dan boleh diukur. Luas nukleus dan luas sel mungkin berbeza pada peringkat-peringkat berlainan dalam edaran sel. Contohnya, Davidson *et al.*, (1978) mendapati bahawa isipadu nukleus bagi sel interfasa adalah tidak berkorelasi dengan kandungan DNA nukleusnya.

Penentuan Kandungan DNA Nukleus

Clowes (1956a; 1956b; 1958) telah menunjukkan bahawa kadar sintesis DNA yang ada hubungannya dengan kadar pembahagian sel adalah berbeza di dalam meristem akar. Menurutnya, bahagian tengah meristem yang dipanggil pusat kuisen mempunyai kadar sintesis DNA yang jauh lebih rendah berbanding semua bahagian meristem yang lain. Tempoh edaran mitosis yang dibandingkan daripada beberapa spesies berbeza didapati berkait rapat dengan kandungan DNA nukleusnya (Van't Hof, 1965). Kajian terhadap 7 spesies berbeza oleh Van't Hof (1965) mendapati bahawa tempoh purata edaran sel dalam meristem hujung akar adalah pada kadar 0.3 jam/ pg DNA.

Dalam kajian ini, kandungan DNA nukleus diukur menggunakan sistem analisis imej (image analyser system) melalui pakej perisian untuk pengukuran DNA. Aplikasi analisa imej untuk pengukuran kandungan DNA nukleus dan tahap ploidi telah

dilakukan dengan meluas selain daripada pengukuran dengan kaedah mikrodensitometer dan sitometri aliran (flow cytometry). Wojcik *et al.*, (1993) telah membuat kajian analisa perbandingan pengukuran DNA nukleus menggunakan penganalisa imej dan sitometri aliran dan telah mendapati bahawa keputusan yang diperolehi daripada kedua-dua kaedah ini adalah setanding.

Apabila sel meristematik berhenti membahagi, ia akan berehat sama ada pada G1 atau G2- (pra atau post-sintetik interfasa) pada fasa edaran sel (Van't Hof, 1985). Bagaimanapun, replikasi DNA masih boleh berlaku walaupun sel tidak membahagi. Hasilnya, sel dengan kandungan DNA nukleus yang lebih besar daripada 4C didapati, di mana 1C adalah kandungan DNA nukleus bagi genom haploid yang tidak bereplikasi bagi sesuatu gamet (Swift, 1950). Dalam usaha untuk mendapatkan bilangan sel pada G1 dan G2 bagi akar primer hujung akar carnation dan nisbah G2 : G1 (Francis dan Lyndon, 1978), pewarnaan tetap Feulgen dengan teknik menekan ('squash') bagi akar primer carnation dianalisa menggunakan alat penganalisa imej.

Prinsip yang digunakan oleh alat penganalisa imej adalah sama dengan densitometrik iaitu menggunakan integrasi ketumpatan optik (IOD) pada data nukleus yang telah ditentukan sebagai nukleus rujukan (reference cell). Sel rujukan yang selalu digunakan ialah sel-sel pada peringkat profasa = 4C dan telofasa = 2C (sel yang baru selesai membahagi). Pada peringkat ini, kandungan DNA dalam nukleus sel rujukan kelihatan tumpat dan padat. Nilai purata untuk 20 sel rujukan ditentukan dan

berdasarkan nilai ini sel-sel interfasa diukur. Nilai IOD ini berkadar dengan kandungan DNA dalam nukleus yang telah diwarnakan dengan pewarnaan seperti Feulgen. Nilai $2C$ boleh diperolehi dengan melakukan tentukur nilai IOD pada nukleus sel rujukan. Nilai $1C$ ditakrifkan sebagai satu nilai tetap bagi haploid genom yang tidak direplikasi pada gamet dan nilai ini digunakan sebagai petunjuk kepada fasa komponen dalam edaran sel. Untuk satu slaid, 50 sel interfasa yang dipilih secara rawak diukur kandungan DNA nukleusnya dan kemudian satu histogram dibuat. Pengukuran nilai DNA nukleus ini memerlukan 3 slaid dengan jumlah sel adalah 150 semuanya. Satu histogram untuk ketiga-tiga slaid perlu dilakarkan. Daripada histogram ini, peratus sel dalam fasa G1, S, G2 dan poliploid boleh ditentukan.

Masa Penggandaan Sel (Cdt)

Kaedah pengukuran kadar mitosis telah lama diketahui, iaitu menggunakan kaedah pengumpulan metafasa dengan perlakuan kolkisin dan / ataupun dengan melabelkan nukleus meristem menggunakan prekursor radioaktif. Meristem yang digunakan adalah daripada akar primer tumbuhan kajian. Dalam kajian ini, masa penggandaan sel dengan pengumpulan metafasa oleh kolkisin telah dilakukan. Prinsip teknik ini adalah kolkisin menghalang anafasa, tetapi tidak mengganggu kadar kemasukan sel ke dalam mitosis. Jadi, sekiranya meristem diperlakukan dengan kolkisin pada jangkamasa singkat, kadar kemasukan ke dalam mitosis boleh diukur dan dengan itu purata tempoh edaran mitosis boleh dikira (Clowes, 1961). D'Amato dan Avanzi

(1948) mendapati bahawa perlakuan lebih lama dengan kolkisin menyebabkan darjah penghasilan poliploid yang berbeza di dalam meristem akar. Contohnya, bahagian apeks kekal diploid dan telah didapati kemudiannya ia adalah bahagian kuisen di mana sel-selnya kekal diploid kerana tidak menjalani mitosis atau menjalaninya pada kadar yang perlahan.

Masa penggandaan sel adalah tempoh bagi sesuatu populasi sel untuk menggandakan populasinya. Kaedah ini cuma sesuai jika kolkisin tidak mengubah kadar sel memasuki mitosis. Jadi, kepekatan kolkisin yang tertentu dan jangka masa pengumpulan metafasa yang sesuai perlu ditentukan terlebih dahulu. Jangka masa pengumpulan sel yang terlalu lama tidak boleh diambil kira (MacLeod, 1972) kerana ia menyebabkan pertambahan frekuensi mitosis yang tidak normal.

3.2 BAHAN DAN KAEDAH

3.2.1 Penyediaan Slaid Tetap

Biji benih *Dianthus caryophyllus* Linn. cv. Grenadin dicambahkan secara aseptik pada suhu $25 \pm 1^\circ \text{C}$ dengan kalacahaya 16 jam cahaya dan 8 jam gelap seperti yang diterangkan sebelum ini (lihat 2.2). Sekurang-kurangnya 6 akar primer dengan panjang piawai $11.15 \pm 0.33\text{mm}$ daripada anak cambah berusia 4 hari diawetkan di dalam larutan 3 : 1 (v/v) etanol tulen : asid asetik glasial selama sekurang-kurangnya

24 jam. Selepas 24 jam, akar ini dicuci dengan air suling selama 10 minit untuk membersihkan akar tadi daripada sisa alkohol yang masih ada. Selepas itu, akar dihidrolisis dalam 5M HCl selama 30 minit pada suhu bilik. Seterusnya, akar-akar ini dibersihkan semula dengan air suling yang telah disejukkan sebanyak 2 kali selama 5 minit setiap kali cucian. Akhirnya, ia diwarnakan dengan larutan Feulgen selama 2 jam ditempat gelap. (Untuk cara penyediaan pewarnaan Feulgen, lihat Apendiks 1).

Selepas 2 jam, bahagian hujung akar yang diwarnakan lebih terang (ungu) diambil dan dihancurkan di atas slaid. Setitik asid asetik 45% (v/v) diletakkan pada akar yang dihancurkan tadi. Kemudian, dengan perlahan sisip kaca diletakkan di atas slaid tersebut dan diketuk dengan belakang jarum untuk memastikan sel-sel tersebut tersebar dan menjadi satu lapisan. Slaid diletakkan di antara kertas turas dan dengan perlahan-lahan ditekan dengan ibu jari (teknik 'squash').

Slaid kemudiannya disembur dengan alat penyembur pembekuan ('freeze spray') atau diletakkan di atas blok ais kering (CO_2 pepejal) sehingga benar-benar membeku dan seterusnya sisip kaca dibuang dengan menggunakan mata pisau (skalpel). Kelebihan teknik pembekuan ini ialah kerana lebih mudah untuk memisahkan sisip kaca daripada slaid dengan kehilangan sel yang minima dan menghasilkan slaid tetap yang baik (Conger dan Fairchild, 1953). Slaid-slaid ini dicuci dengan cara dehidrasi menggunakan satu siri larutan alkohol (lihat Apendiks 1). Sisip kaca baru diletakkan

di atas slaid dengan menggunakan DPX dan dibiarkan seketika untuk mengeringkannya. Slaid yang telah siap disimpan di dalam kotak slaid dan sedia untuk diperiksa.

3.2.2 Pengiraan Indeks Mitosis (MI)

Slaid tetap yang telah disediakan sebelumnya (lihat 3.2.1, m.s. 58) diperiksa di bawah mikroskop. Sel-sel yang sedang menjalani peringkat mitosis (jumlah profasa, metafasa, anafasa dan telofasa) dikira sebagai peratus sel, ditentukan sebagai (x). Sebanyak 1500 sel pada transek rawak daripada 3 slaid telah dikira. 500 sel dikira bagi setiap slaid.

Indeks Mitosis (MI);

$$\frac{x}{500} \times 100\% = Y\%$$

sekurang-kurangnya 3 slaid telah digunakan untuk tujuan ini dan purata nilai indeks mitosis serta sisihan piawainya, S_E dikira.

3.2.3 Bilangan Kromosom

Bilangan kromosom dikira menggunakan slaid tetap yang telah disediakan (seperti 3.2.1, m.s. 58). Sekurang-kurangnya 15 sel pada peringkat metafasa dikira daripada 3

slaid tetap yang berlainan. Purata bilangan kromosom dan julatnya ditentukan di bawah 'oil immersion' dengan 100x pembesaran.

3.2.4 Penyediaan Slaid Tetap Teknik 'Non-squash'

Akar primer *Dianthus caryophyllus* berusia 4 hari dengan panjang piawai 11.15 ± 0.33 mm diawet di dalam larutan 3 : 1 (v/v) etanol:asid asetik glasial. Sampel ini diwarnakan dengan larutan Feulgen seperti yang diterangkan sebelum ini (lihat 3.2.1, m.s. 58). Penyediaan slaid adalah sama kecuali sel-selnya tidak ditekan (non-squash) (Armstrong dan Francis, 1985) untuk memastikan saiz sel dan bentuk nukleus serta diameternya tidak berubah bentuk atau berubah paling sedikit yang mungkin (Bansal dan Davidson, 1978). Kemudian, slaid ini dicuci melalui siri pencucian seperti yang ditunjukkan di dalam Apendiks 1. Melalui kaedah ini, slaid-slaid dicuci dengan siri alkohol dan kemudiannya dicelup ke dalam larutan 0.2% (w/v) 'light green' di dalam 100% etanol selama 2.5 minit. Kemudiannya, ia dicelup semula ke dalam larutan 100% (v/v) etanol selama 10 minit. Slaid-slaid ini akhirnya dibersihkan dengan larutan xilena selama 10 minit sebelum sisip kaca dikenakan ke atas slaid menggunakan DPX.

3.2.5 Pengukuran Luas Sel dan Luas Nukleus.

Slaid yang telah disediakan seperti bahagian 3.2.1 (m.s.58) diperiksa di bawah mikroskop cahaya (Zeiss Axioskop 40x 'oil' objektif) yang disambung kepada sistem yang mengandungi hos komputer, 1 monitor menu, 1 monitor imej, video kamera dan tablet grafik digital. Imej diperolehi dengan cip tunggal SONY Black/White dan seterusnya muncul sebagai imej digital pada monitor VGA. Perimeter sel dan nukleus dilakar menggunakan tetikus yang bersambung dan imej lakaran muncul bersisi pada monitor televisyen. Dengan menanda (kalibrat) skrin monitor pada unit μm^2 , pengiraan perimeter ditukar kepada pengukuran luas sel dalam unit μm^2 menggunakan program komputer. Luas sel dan luas nukleus ditentukan secara automatik menggunakan program makro daripada perisian piawai VIDAS. Untuk penentuan luas sel dan luas nukleus, 150 sel profasa diukur untuk setiap sampel. Nisbah luas nukleus : luas sel ditentukan untuk setiap sampel.

3.2.6 Penentuan Kandungan DNA Nukleus

Penyediaan slaid tetap akar primer *Dianthus caryophyllus* berusia 4 hari pada panjang piawai dilakukan seperti pada bahagian 3.2.1 (m.s. 58). Kemudian, slaid ini digunakan untuk dianalisa menggunakan mikroskop cahaya (Zeiss Axioskop) yang disambung kepada sistem penganalisa imej VIDAS 21 daripada Kontron Elektronik. Sistem penganalisa imej ini menggunakan pakej perisian untuk pengukuran DNA.

Perisian ini membenarkan pengiraan dan penilaian data dibuat. Daripada setiap histogram ploidi, kandungan DNA yang dinilai antara $0 - 2.2C$ dianggap berada dalam fasa G1, $2.2 - 3.6C$ berada pada fasa S, $3.6 - 4.8C$ pada fasa G2 dan $> 4.8C$ dikira sebagai poliploid (Evans dan Van't Hof, 1974). Ini bererti, taburan normal bagi nukleus G2 adalah daripada $3.6 - 4.8C$. Oleh itu, dalam kajian ini, nukleus yang ketumpatannya $> 4.8C$ dikelaskan sebagai poliploid. Kandungan DNA nukleus di dalam sel interfasa adalah berdasarkan pada nilai C sel rujukan yang ditentukan daripada sel profasa dan telofasa pada slaid yang sama. Peratus frekuensi nukleus pada nilai C DNA yang berbeza dikira sebagai $< G1$, $G1$, S , $G2$ dan $\text{sel} > G2$; yang dikelaskan berdasarkan nilai C DNA < 1.6 , $1.6 - 2.4$, $2.4 - 3.6$, $3.6 - 4.8$ dan > 4.8 masing-masing (Evans dan Van't Hof, 1974).

3.2.7 Penentuan Masa Penggandaan Sel (Cdt)

Anak cabang *Dianthus caryophyllus* yang berusia 4 hari dengan panjang akar piawai $11.15 \pm 0.03\text{mm}$ diambil dan didedahkan kepada larutan 0.025% (w/v) kolkisin selama 6 jam. Akar primer diawet pada permulaan eksperimen dan dianggap pada masa 0 jam sebagai kawalan. Setiap 1 jam sehingga tempoh 6 jam, larutan kolkisin dikeluarkan dan akar diawet dengan larutan 3 : 1 (v/v) etanol : asid asetik glasial; untuk penyediaan slaid tetap (lihat 3.2.1, m.s. 58). Tiga slaid digunakan untuk mengira pengumpulan metafasa. Pada sampel 0 jam, indeks mitosis, frekuensi metafasa dan frekuensi profasa, anafasa dan telofasa telah direkodkan. Kemudiannya,

cuma frekuensi profasa dan metafasa sahaja direkodkan sehingga tamat tempoh perlakuan. Hubungan linear di antara kadar pengumpulan metafasa yang digalakkan oleh kolkisin melawan masa telah digunakan untuk mengira purata masa penggandaan sel menggunakan formula Clowes (1961) (Modifikasi kaedah Evans, *et. al.*, 1957). Formula tersebut adalah;

$$\text{Masa penggandaan sel} = \frac{\ln 2}{m}$$

di mana m = kadar pengumpulan sel pada metafasa, iaitu sama dengan kadar kemasukan sel ke dalam mitosis, selepas pendedahan kepada kolkisin bila tiada sel yang melepasi peringkat metafasa dan apabila bilangan sel pada peringkat profasa kekal tetap.

3.3 KEPUTUSAN

3.2.8 Indeks Mitosis, MI

Indeks mitosis (MI) bagi akar *Dianthus caryophyllus* yang berusia 4 hari dengan panjang piawai 11.15 ± 0.33 mm adalah $43.51 \pm 2.14\%$. 1500 sel dilihat daripada 5 slaid yang berbeza. Keputusan yang didapati ditunjukkan di dalam Jadual 2 (m.s. 68).

3.2.9 Bilangan Kromosom

Purata bilangan kromosom bagi sel-sel akar primer tumbuhan *Dianthus caryophyllus* yang ditanam secara *in vivo* didapati adalah 29.73 ± 0.12 dengan julat kromosom di antara 29-30 (Plat 3, m.s. 69). Carolin (1957) telah menyenaraikan bilangan kromosom bagi genus *Dianthus* dan mendapati bahawa *Dianthus caryophyllus* Linn mempunyai bilangan kromosom $2n = 30$.

3.3.3 Penentuan Luas Sel dan Luas Nukleus Carnation yang Ditanam Secara *in vivo*.

Daripada pemerhatian yang dijalankan, didapati purata luas sel profasa bagi akar-akar primer sel carnation dengan panjang piawai 11.15 ± 0.33 mm dan berusia 4 hari adalah $142.90 \pm 0.59 \mu\text{m}^2$ (Rajah 1A). Purata luas nukleusnya pula adalah $26.59 \pm 0.09 \mu\text{m}^2$ (Rajah 1B). Nisbah purata luas nukleus/luas sel adalah 0.19. Perubahan luas nukleus didapati berkadar terus (selari) dengan perubahan luas sel, di mana semakin besar nilai luas sel maka semakin besar juga nilai luas nukleusnya.

Data bagi luas sel dan luas nukleus sel-sel primer carnation yang ditanam secara *in vivo* ditunjukkan di dalam Jadual 3 (m.s. 70).

3.2.10 Pengukuran Kandungan DNA Nukleus dan Penentuan Tahap Ploidi

Taburan kandungan DNA nukleus sel-sel akar primer *Dianthus caryophyllus* cv. Grenadin yang berusia 4 hari dengan panjang piawai 11.15 ± 0.03 mm adalah di antara 3.4 - 13C (Rajah 2). Ia menunjukkan bahawa tiada sel berada pada fasa G1, 1.32% sel berada pada fasa S, 3.95% pada fasa G2 dan 94.74% sel didapati mengandungi kandungan DNA nukleus yang lebih daripada 4.8C (poliploid).

Data taburan kandungan DNA nukleus bagi sel-sel primer carnation yang ditanam secara *in vivo* ditunjukkan di dalam Jadual 4.

3.2.11 Masa Penggandaan Sel (Cdt)

Purata indeks mitosis (MI) pada masa 0 jam bagi akar primer carnation berusia 4 hari yang didapati adalah $43.71 \pm 0.78\%$. Nilainya tidak berbeza dengan signifikan ($p > 0.05$) jika dibandingkan dengan nilai MI sel-sel akar yang ditanam secara *in vivo* iaitu $43.52 \pm 2.14\%$. Indeks mitosis yang tinggi ini membolehkan pengumpulan sel yang cepat pada peringkat metafasa dan memudahkan pengiraan. Jadual 5 menunjukkan peratus frekuensi indeks mitosis pada 0 jam dan peratus frekuensi profasa dan metafasa dari 0 hingga 6 jam, mengikut tempoh pendedahan kepada kolkisin. Didapati, bilangan sel yang terkumpul pada peringkat metafasa adalah berkadar terus dengan masa pendedahan (daripada $5.12 \pm 0.08\%$ pada 0 jam kepada

10.44 ± 0.38% pada 6 jam). Peratus frekuensi sel pada peringkat profasa adalah lebih kurang konstan di sepanjang eksperimen (kira-kira 37%). Beberapa sel pada peringkat anafasa dan telofasa telah dilihat sepanjang 4 jam pertama perlakuan, bagaimanapun keputusan ini tidak direkodkan di dalam Jadual 5.

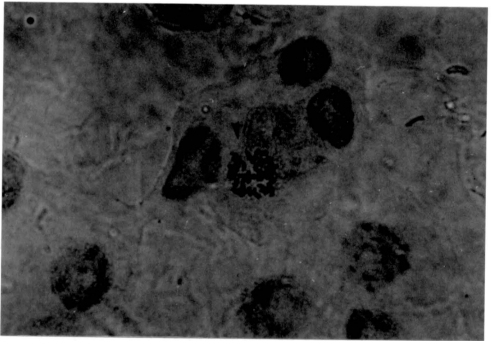
Persamaan regresi ($Y = 1.05x + 3.53$; $r = 0.96$) didapati daripada hubungan di antara peratus frekuensi metafasa melawan masa pendedahan kepada kolkisin (Graf 2). Nilai kecerunan graf pada persamaan ini memberikan kadar pengumpulan sel pada metafasa, iaitu sebanyak 1.05% per jam. Dengan menggunakan formula Clowes (1961) (lihat 3.2.7), bagi akar primer *in vivo* *Dianthus caryophyllus* berusia 4 hari adalah 66.11 jam.

Jadual 2 : Jadual 2 menunjukkan purata indeks mitosis, MI bagi sel-sel akar primer carnation yang ditanam secara *in vivo* dan berusia 4 hari dengan panjang piawai 11.05 ± 0.03 mm. Lima slaid telah digunakan.

Bilangan slaid	Indeks mitosis, MI (%)
1	44.40
2	40.26
3	39.50
4	51.40
5	42.00
Purata MI \pm S _E	43.51 \pm 2.14

Plat 3

Sel meristem akar *Dianthus caryophyllus* Linn. cv. Grenadin pada peringkat metafasa menunjukkan bilangan kromosom $2n = 30$.



Jadual 3 : Jadual menunjukkan purata nilai luas sel dan luas nukleus bagi sel-sel akar primer carnation yang ditanam secara *in vivo*.

Perlakuan	Purata luas sel, μm^2	Purata luas nukleus, μm^2	Nisbah luas nukleus/luas sel
Sel-sel akar primer <i>in vivo</i>	142.90 \pm 0.59	26.59 \pm 0.09	0.19

Jadual 4 : Jadual menunjukkan taburan kandungan DNA nukleus bagi sel-sel akar primer carnation yang ditanam secara *in vivo*.

Perlakuan	G1 (%) 0.0 – 2.2 <u>C</u>	S (%) 2.2 – 3.6 <u>C</u>	G2 (%) 3.6 – 4.8 <u>C</u>	Poliploidi (%) >4.8 <u>C</u>
Sel-sel akar primer <i>in vivo</i>	0.00	1.32	3.95	94.74



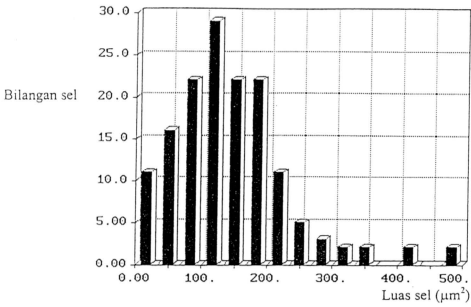
Rajah 1A

Taburan luas sel bagi sel-sel akar primer carnation yang ditanam secara *in vivo*.

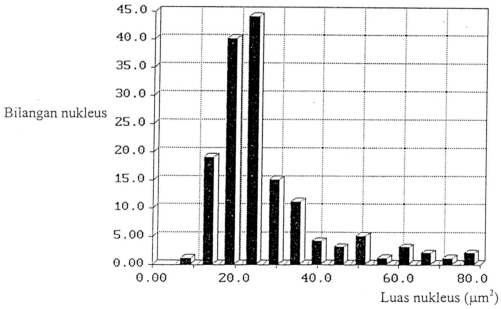
Rajah 1B

Taburan luas nukleus bagi sel-sel akar primer carnation yang ditanam secara *in vivo*.

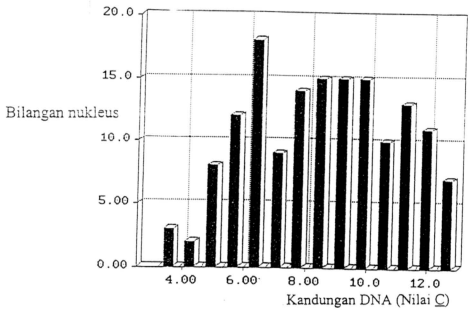
1A



1B

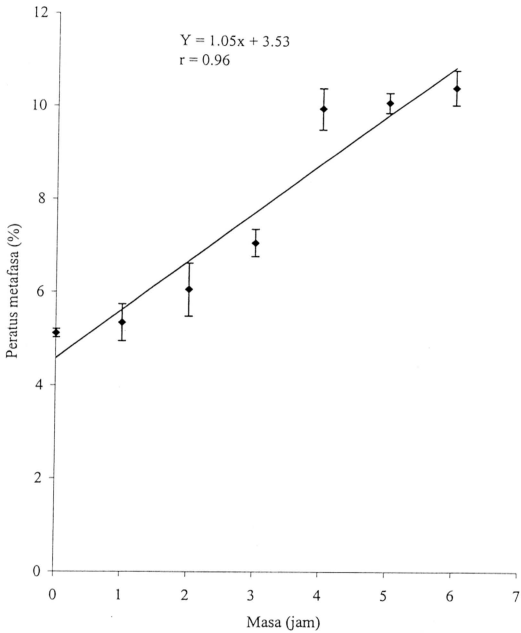


Rajah 2 : Taburan kandungan DNA nukleus (nilai C) bagi sel-sel akar primer carnation yang ditanam secara *in vivo* pada peringkat metafasa.



Jadual 5 : Hubungan di antara peratus frekuensi profasa, metafasa dan indeks mitosis apabila sel-sel akar primer carnation *in vivo* berusia 4 hari didedahkan kepada 0.025% (w/v) kolkisin selama 6 jam.

Tempoh pendedahan kepada kolkisin(jam)	Peratus frekuensi		
	Profasa	Metafasa	Indeks mitosis (%)
0	37.22 ± 0.77	5.12 ± 0.09	43.71 ± 0.78
1	37.68 ± 3.79	5.35 ± 0.40	-
2	37.75 ± 2.56	6.06 ± 0.57	-
3	38.69 ± 3.31	7.07 ± 0.29	-
4	38.56 ± 0.65	9.96 ± 0.45	-
5	38.01 ± 3.33	10.10 ± 0.22	-
6	37.10 ± 1.50	10.44 ± 0.38	-



Graf 2 : Perkaitan di antara peratus frekuensi metafasa dan tempoh dedahan kepada 0.025% kolkisin bagi sel-sel akar primer *Dianthus caryophyllus* Linn. cv. Grenadin yang ditanam secara *in vivo*.

3.4 RINGKASAN KEPUTUSAN

1. Purata MI bagi sel-sel akar primer *Dianthus caryophyllus* cv. Grenadin yang berusia 4 hari dengan panjang piawai $11.15 \pm 0.33\text{mm}$ dan ditanam secara *in vivo* adalah $43.51 \pm 2.14\%$.
2. Bilangan kromosom sel-sel akar carnation yang ditanam secara *in vivo* adalah 29.73 ± 0.13 dengan julat 29 - 30.
3. Perubahan luas nukleus bagi sel-sel carnation yang ditanam secara *in vivo* didapati berkadar terus dengan luas selnya. Purata luas sel yang diukur adalah $142.90 \pm 0.59\mu\text{m}^2$ dan purata luas nukleusnya adalah $26.59 \pm 0.09\mu\text{m}^2$.
4. Taburan kandungan DNA nukleus bagi sel-sel carnation yang ditanam secara *in vivo* adalah di antara 3.4 - 13.0C. Tiada sel berada pada fasa G1 edaran sel, cuma 1.32% pada fasa S, 3.95% pada fasa G2 dan 97.74% adalah poliploid.
5. Masa penggandaan sel (Cdt) sel-sel akar primer carnation yang ditanam secara *in vivo* yang berusia 4 hari adalah 66.11 jam.