

**BAB 4 : PENGKULTURAN SEGMENT AKAR DAN KAJIAN SITOLOGI  
AKAR *IN VITRO* *Dianthus caryophyllus* CV. GRENADIN**

**4.1 PENGENALAN**

**4.1.1 Kultur Aseptik Segment Akar *Dianthus caryophyllus* Linn.**

Kekurangan potensi regeneratif selalunya berkait rapat dengan keganjilan atau kecacatan sel dan nukleus seperti penghasilan sel-sel aneuploidi dan poliploidi. Hasil variasi dari segi sitologi mungkin digambarkan oleh tumbuhan yang diregenerasikan. Kadangkala, ia tidak diperlukan sama sekali terutamanya di dalam program propagasi klonal. Namun begitu, ia juga boleh membawa kebaikan, contohnya untuk pemilihan tumbuhan bermutu tinggi (Vasil, 1983; Skirvin, 1978).

Regenerasi tumbuhan lengkap dari sistem kultur adalah perlu untuk propagasi tumbuhan *in vitro*, penyelidikan ke atas kejuruteraan genetik, pemahaman proses morfogenetik tumbuhan dan sebagainya. Bagaimanapun, tumbuhan yang diregenerasikan dari sistem *in vitro* biasanya dilaporkan mempunyai keganjilan kromosom. Tambahan pula, telah diketahui bahawa aberasi nukleus atau kromosom seperti inversi, translokasi, poliploidi dan aneuploidi didapati hadir di dalam sel

## BAB 4 : PENGKULTURAN SEGMENT AKAR DAN KAJIAN SITOLOGI

### AKAR *IN VITRO* *Dianthus caryophyllus* CV. GRENADIN

#### 4.1 PENGENALAN

##### 4.1.1 Kultur Aseptik Segmen Akar *Dianthus caryophyllus* Linn.

Kekurangan potensi regeneratif selalunya berkait rapat dengan keganjilan atau kecacatan sel dan nukleus seperti penghasilan sel-sel aneuploidi dan poliploidi. Hasil variasi dari segi sitologi mungkin digambarkan oleh tumbuhan yang diregenerasikan. Kadangkala, ia tidak diperlukan sama sekali terutamanya di dalam program propagasi klonal. Namun begitu, ia juga boleh membawa kebaikan, contohnya untuk pemilihan tumbuhan bermutu tinggi (Vasil, 1983; Skirvin, 1978).

Regenerasi tumbuhan lengkap dari sistem kultur adalah perlu untuk propagasi tumbuhan *in vitro*, penyelidikan ke atas kejuruteraan genetik, pemahaman proses morfogenetik tumbuhan dan sebagainya. Bagaimanapun, tumbuhan yang diregenerasikan dari sistem *in vitro* biasanya dilaporkan mempunyai keganjilan kromosom. Tambahan pula, telah diketahui bahawa aberasi nukleus atau kromosom seperti inversi, translokasi, poliploidi dan aneuploidi didapati hadir di dalam sel

tumbuhan dari sistem kultur tisu dalam banyak spesies tumbuhan (Lee dan Philips, 1988). Secara umumnya, pengumpulan keganjilan ini adalah berkorelasi dengan tempoh kultur. Di dalam beberapa kes, kehilangan potensi morfogenetik didapati telah berlaku (Torrey, 1967; Evans dan Sharp, 1983). Bagaimanapun, bagi beberapa tumbuhan seperti *Pinus*, kandungan DNA nukleusnya adalah stabil walaupun selepas dikultur pada jangkamasa yang panjang (Renfroe dan Berlyn, 1984; Hakman *et al.*, 1984). Contohnya, kultur jangka panjang *Vicia faba* yang dimulakan daripada tisu embrio dan akar, kalusnya didapati berkebolehan menghasilkan akar pucuk tanpa kehadiran poliploidi dan aneuploid (Taha dan Francis, 1990).

Beberapa kajian ke atas variasi kelakuan sel telah dijalankan seperti indeks mitosis, bilangan kromosom dan masa panggandaan sel semasa kultur jangka pendek. Kajian kelakuan sel bagi meristem akar *in vivo* dan *in vitro* adalah penting untuk menentukan variasi somaklonal. Kajian sel memungkinkan penskrinan tumbuhan 'true-to-type', iaitu jika komposisi sel di dalam kalus didapati tetap sama dengan induk, peluang supaya tumbuhan yang diregenerasikan mungkin sama dengan induknya adalah tinggi.

Terdapat pelbagai perubahan yang berlaku terhadap kelakuan kromosom bagi tisu *in vitro* semasa kultur beberapa spesies tumbuhan dijalankan. Kultur tisu tumbuhan dilakukan secara umumnya adalah untuk meregenerasikan tumbuhan normal daripada sel atau tisu yang dikulturkan. Oleh itu, kestabilan kromosom adalah langkah yang

perlu dalam pembezaan dan regenerasi tumbuhan. Walaupun begitu, didapati sel tumbuhan yang dikulturkan secara *in vitro* menunjukkan pelbagai darjah ketidakstabilan nukleus (Bayliss, 1980; D'Amato, 1977a; Sunderland, 1977).

Dalam eksperimen ini, eksplan akar daripada anak cambah berusia 4 hari dengan panjang piawai diantara 7.88mm dan 14.42mm telah dipilih sebagai sumber eksplan. Akar-akar yang dipilih itu dianggap paling sama yang mungkin atau 'homogenous' dari segi status perkembangannya dengan akar yang digunakan dalam sitologi akar *in vivo*. Ini bertujuan untuk meminimakan variasi yang wujud di antara akar-akar. Oleh itu, perbandingan kelakuan sel di antara akar yang ditanam secara *in vivo* dan *in vitro* boleh dianggap munasabah. Tisu daripada hujung akar (5mm) digunakan untuk memulakan kultur dan untuk mendapatkan regenerasi tumbuhan lengkap.

Eksplan akar dikultur di atas media Murashige dan Skoog (MS) yang ditambah dengan pelbagai komposisi hormon yang berbeza seperti ditunjukkan di dalam bahagian 4.2.2 (ms 83). Tujuannya adalah untuk menentukan media optima untuk kultur akar *in vitro*. Pelbagai organ vegetatif lain seperti hujung pucuk, daun, batang dan batang bernod turut digunakan untuk mendapatkan regenerasi tumbuhan apabila eksplan akar didapati gagal untuk meregenerasikan pucuk. Keputusannya dilaporkan di dalam bab 5. Salah satu daripada tujuan eksperimen ini juga adalah untuk menentukan media optima untuk pembentukan akar.

Rahsia regenerasi tumbuhan boleh diterokai melalui kajian sitologi. Pemerhatian ke atas aktiviti sel yang berlaku di sepanjang eksperimen kultur tisu yang dilakukan boleh menyumbangkan maklumat tentang bagaimana dan apakah keadaan yang paling sesuai untuk regenerasi berlaku. Selalunya, perubahan sitologi akan berlaku di dalam sel somatik semasa kultur *in vitro* dilakukan (Kao *et al.*, 1970). Semakin meningkat pertumbuhan, perubahan sel akan berlaku dan membentuk sel-sel poliploid, walaupun asalnya sel-sel itu mungkin di dalam keadaan diploid. Analisa kandungan DNA nukleus tumbuhan boleh menunjukkan hubungan di antara sel poliploid dengan pertambahan kandungan DNA (Partanen, 1963). Pengumpulan kandungan DNA dalam fasa-S menunjukkan permulaan berlakunya endomitosis, iaitu mekanisme untuk kemunculan poliploid. Selain tahap DNA nukleus yang mencirikan kewujudan poliploid, ia boleh ditentukan dengan mengira bilangan kromosom.

Kultur tisu mungkin menghasilkan bilangan kromosom yang berbeza daripada strain induknya. Dalam bab ini, kajian sitologi bagi carnation yang dikultur secara *in vitro* seperti penentuan indeks mitosis, bilangan kromosom, masa penggandaan sel (Cdt), kandungan DNA nukleus, luas sel dan luas nukleus disiasat daripada akar yang telah dikultur selama 1, 2, 3, 4 hari dan 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, dan 8 minggu serta 3, 4 dan 6 bulan. Tujuannya adalah untuk membandingkan kelakuan sel akar bagi carnation yang ditanam secara *in vivo* dengan sel akar yang dikenakan kepada sistem kultur tisu. Data eksperimen bagi carnation yang di tanam secara *in vivo* digunakan sebagai

data kawalan di mana data eksperimen daripada tumbuhan yang dikultur secara *in vitro* akan dibandingkan.

## 4.2 BAHAN DAN KAEDAH

### 4.2.1 Penentuan Media Optima Untuk Pertumbuhan Akar dan Regenerasi Tumbuhan.

#### a) Penyediaan Media Kultur

Media yang telah digunakan adalah Murashige dan Skoog (1962) (MS) yang ditambah dengan 0.5 - 3.0mg/l NAA dan BAP. Komponen lengkap media ini diberikan di dalam Apendiks 1. Kajian untuk menentukan kepekatan hormon NAA dan BAP serta kombinasi kedua-dua hormon ini telah dijalankan seperti dilaporkan di dalam bahagian 4.2.2 (m.s. 83). Bagaimanapun bagi segmen akar carnation, media MS yang ditambah dengan 2mg/l NAA didapati merupakan media yang berupaya untuk memula dan meregenerasi akar yang optima. Keadaan persekitaran tumbesaran di sepanjang kajian ini adalah pada suhu  $25 \pm 1$  °C dengan kitaran cahaya/gelap 16 jam cahaya yang dihasilkan daripada lampu kalimantang dan 8 jam gelap. Media MS yang ditambah dengan 2 mg/l NAA disediakan dan pH media ditetapkan pada 5.8 sama ada dengan natrium hidroksida atau asid hidroklorik, sebelum diautoklaf selama 20 minit pada suhu 120 °C. Media cair ini dituang ke dalam tiub steril berdiameter 20

mm dan tinggi 55 mm. Media ini digunakan secara meluas sepanjang kajian ini dijalankan.

#### **b) Pensterilan Tumbuhan : Teknik Aseptik**

Cara terbaik untuk mendapatkan sumber tumbuhan yang steril untuk kerja-kerja kultur tisu adalah dengan menyahkumkan biji benih yang digunakan dan mencembangkannya di dalam persekitaran yang aseptik. Melalui kaedah ini, kontaminasi eksplan dan biji benih tumbuhan 'intact' dapat dikurangkan. Di dalam kajian ini, permukaan biji benih disterilkan dengan mencucinya menggunakan air suling, diikuti dengan merendam dan menggoncangkannya di dalam 100% (v/v) larutan klorox selama 2 minit serta dicampur dengan 2 titik larutan Tween 20. Selepas itu, biji benih dicuci dengan siri larutan klorox berkepekatan 70% (v/v), 50% (v/v) dan 30% (v/v) selama 3 minit setiap satu dan 10% (v/v) selama 5 minit. Biji benih seterusnya dicuci dengan air suling untuk membilas sisa Klorox yang masih ada.

Dalam eksperimen ini, biji benih dicambahkan di dalam piring petri kaca steril yang telah diautoklafkan selama 30 minit pada suhu 120° C. Di dalam 'laminar-flow chamber', biji benih direndam di dalam larutan 70 % (v/v) etanol selama 10 saat dan dibilas 3 kali dengan air suling steril sebelum dicambahkan. Piring petri ini diletakkan di dalam bilik kultur bersuhu 25 ± 1° C dengan kitaran cahaya / gelap 16 jam cahaya dan 8 jam gelap.

Biji benih yang sedang bercambah disirami dengan air suling steril 2 hari sekali. Pada hari ke 4, hujung segmen akar primer dengan panjang piawai  $11.15 \pm 0.33$  mm dipotong dan direndam selama beberapa saat di dalam 70% (v/v) etanol. Seterusnya ia dibilas 3 kali menggunakan air suling steril. Hujung akar yang panjangnya kira-kira 5mm dikultur di atas media MS yang ditambah dengan 2 mg/l NAA dan disimpan di dalam bilik kultur. Pemerhatian dibuat pada hari 1, 2, 3, 4, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 dan 56 serta 3, 4, dan 6 bulan selepas dikultur.

#### **4.2.2 Penentuan Hormon Yang Sesuai**

Akar primer carnation yang berusia 4 hari dikultur di atas pelbagai kombinasi media MS yang ditambah dengan NAA dan BAP untuk mendapatkan media terbaik bagi penghasilan akar sekunder yang banyak. Pemerhatian juga dibuat untuk memerhatikan sama ada akar akan membentuk plantlet. Media yang telah digunakan disenaraikan di dalam Jadual 6 (m.s 84) dan pemerhatiannya dijadualkan di dalam Jadual 1 Apendiks II (m.s. 266)

#### **4.2.3 Penentuan Indeks Mitosis (MI) *in vitro***

Akar-akar baru yang terbentuk diawetkan selepas 1, 2, 3, 4 hari dan 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 dan 8 minggu serta 3, 4 dan 6 bulan dikultur. Pada setiap penyampelan, 6 akar diawet di dalam larutan 3:1 (v/v) etanol : asid asetik glasial. Slaid tetap dengan pewarnaan



**Jadual 6** : Media yang digunakan untuk menentukan hormon yang paling sesuai bagi mendapatkan regenerasi akar.

Bilangan	Media
1	0.5 mg/l BAP
2	1.0 mg/l BAP
3	1.5 mg/l BAP
4	2.0 mg/l BAP
5	0.5 mg/l NAA
6	1.0 mg/l NAA
7	1.5 mg/l NAA
8	2.0 mg/l NAA
9	0.5 mg/l BAP + 1.0 mg/l NAA
10	1.0 mg/l BAP + 1.5 mg/l NAA
11	1.5 mg/l BAP + 1.5 mg/l NAA
12	2.0 mg/l BAP + 1.5 mg/l NAA
13	0.5 mg/l BAP + 2.0 mg/l NAA
14	1.0 mg/l BAP + 2.0 mg/l NAA
15	1.5 mg/l BAP + 2.0 mg/l NAA
16	2.0 mg/l BAP + 2.0 mg/l NAA
17	1.0 mg/l BAP + 3.0mg/l NAA
18	3.0 mg/l BAP + 3.0mg/l NAA

Feulgen dan penyediaan teknik 'squash' dilakukan seperti yang diterangkan sebelum ini (bahagian 3.2.1). Pada setiap masa penyampelan, MI (jumlah profasa, metafasa, anafasa dan telofasa yang diekspresikan sebagai peratusan bagi seluruh sel) telah dikira mengikut siri transek melalui lebar setiap sisip kaca. 500 sel bagi setiap slaid dan 3 slaid bagi setiap masa penyampelan telah dikira.

#### **4.2.4 Pengiraan Bilangan Kromosom *in vitro***

Akar-akar yang didapati dari kultur akar yang berusia 1, 2, 3, 4 hari dan 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 minggu serta 3, 4 dan 6 bulan diawetkan di dalam larutan 3 : 1 (v/v) etanol : asid asetik glasial. Penyediaan slaid tetap dengan pewarnaan Feulgen dan teknik 'squash' disediakan seperti di dalam bahagian 3.2.1. Pada setiap masa penyampelan dilakukan, bilangan kromosom dikira pada peringkat metafasa sel meristem akar. Sekurang-kurangnya 15 plat metafasa dikira pada setiap masa penyampelan yang dijalankan.

#### **4.2.5 Pengukuran Kandungan DNA Nukleus *in vitro***

Prosedur yang sama seperti di dalam bahagian 3.2.4 telah dilakukan. Akar-akar yang muncul daripada kultur akar yang berusia 1, 2, 3, 4 hari dan 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 minggu serta 3, 4 dan 6 bulan yang dikultur di atas media MS dengan 2.0 mg/l NAA diawet dan slaid tetap pewarnaan Feulgen disediakan. Slaid-slaid ini kemudiannya

diperhatikan di bawah mikroskop cahaya dan dianalisa dengan VIDAS 21 sistem penganalisa imej daripada Kontron Elektronik seperti yang diterangkan di dalam 3.2.4.

#### 4.2.6 Pengukuran Luas Sel dan Luas Nukleus *in vitro*

Akar-akar daripada kultur akar berusia 1, 2, 3, 4 hari dan 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 minggu serta 3, 4 dan 6 bulan telah digunakan. Akar-akar ini diawet dan diwarnakan dengan pewarnaan Feulgen. Tanpa ditekan (non-squash), slaid-slaid diwarnakan lagi dengan 0.2% (w/v) 'light green' di dalam larutan 100% (v/v) etanol selama 2.5 minit dan kemudiannya di dalam larutan 100% (v/v) etanol selama 10 minit. Akhirnya slaid-slaid ini dibersihkan di dalam larutan xilena selama 10 minit sebelum dilekatkan sisip kaca dengan menggunakan DPX. Kaedah ini diterangkan dengan mendalam pada bahagian 3.2.5.

#### 4.2.7 Pengiraan Masa Penggandaan Sel (Cdt) *in vitro*

Masa penggandaan sel (Cdt) bagi akar *in vitro* dibuat ke atas sel akar yang mempunyai nilai MI tertinggi. Berdasarkan kepada keputusan pada bahagian 4.2.3, didapati akar yang berusia 3 minggu selepas dikultur mempunyai peratus MI yang tertinggi iaitu  $43.77 \pm 2.33\%$ . Akar-akar ini direndam dengan 0.5ml larutan 0.025% (w/v) kolkisin selama 6 jam. Akar yang diawet pada permulaan eksperimen iaitu pada

masa 0 jam, dijadikan sebagai kawalan. Setiap 1 jam sehingga tempoh 6 jam masa pendedahan kepada kolkisin, larutan kolkisin ini akan dikeluarkan dan akar diawet dengan larutan 3 : 1 (v/v) etanol : asid asetik glasial untuk penyediaan slaid tetap. Kaedah lanjut boleh dirujuk di dalam bahagian 3.2.7 (m.s. 63).

#### 4.3 KEPUTUSAN

##### **Pemerhatian Umum Kultur Akar**

Objektif utama eksperimen ini adalah untuk memerhatikan respons akar *Dianthus caryophyllus* cv. Grenadin terhadap komposisi media yang berbeza untuk mendapatkan regenerasi tumbuhan. Media MS telah dipilih sebagai media asas disepanjang kajian ini dijalankan kerana eksplan carnation didapati memberi respons yang baik di atasnya. Media ini ditambah dengan pelbagai kepekatan dan jenis hormon untuk mendapatkan media optima bagi menghasilkan regenerasi tumbuhan.

Media asas MS tanpa hormon telah digunakan sebagai kawalan. Pada awalnya, diperhatikan segmen akar tumbuh agak memanjang tetapi tiada pembentukan akar sekunder yang didapati. Penambahan hormon secara berasingan atau kombinasi 2 hormon berlainan terutamanya auksin dijangkakan akan menghasilkan akar-akar sekunder yang banyak. Bagaimanapun, daripada 18 kombinasi hormon yang dikaji (lihat Jadual1 App.II) kebanyakannya telah menghasilkan kalus daripada eksplan akar

yang dikultur. Media MS yang ditambah dengan NAA terutamanya 2.0 mg/l NAA didapati berjaya membentuk akar-akar sekunder pada masa yang singkat dan bilangan akar terbanyak. Media MS yang ditambah dengan 2.0 mg/l NAA didapati pada mulanya menghasilkan kalus pada permukaan yang dipotong. Pembentukan kalus cuma sedikit dan berwarna kuning kehijauan. Selepas 7 hari, akar primer didapati memanjang dan membentuk akar-akar sekunder baru yang banyak iaitu di antara 3 hingga 7 akar per eksplan.

#### 4.3.1 Indeks Mitosis (MI)

Kajian sitologi sel meristem akar carnation yang dikultur secara *in vitro* ditentukan daripada akar-akar sekunder yang didapati apabila eksplan akar primer dengan panjang piawai  $11.15 \pm 0.33$  mm dikultur di atas media MS yang ditambah dengan 2 mg/l NAA. Disebabkan akar sekunder hanya terbentuk selepas 5 hari dikultur, kajian sitologi bagi akar berusia 1, 2, 3 dan 4 hari selepas dikultur adalah menggunakan akar primer yang diletakkan di atas media MS + 2.0 mg/l NAA. Slaid-slaid tetap disediakan dengan pewarnaan Feulgen dan teknik 'squash'. Didapati, apabila akar primer dengan panjang piawai  $11.15 \pm 0.33$  mm dipindahkan ke media kultur, nilai MI pada hari pertama selepas dikultur menjadi 41.20%, 40.20% pada hari kedua dan pada hari ketiga nilai MI nya adalah 37.35%. Penurunan nilai MI ini tidak berbeza dengan signifikan ( $p > 0.05$ ) berbanding nilai MI sel-sel akar yang ditanam secara *in vivo* iaitu 43.51%. Nilai MI bagi sel akar *in vitro* yang berusia 4 hari menurun kepada

32.32% dan didapati berbeza dengan signifikan ( $p < 0.05$ ) berbanding akar tumbuhan 'intact' (Jadual 7). Nilai MI didapati meningkat semula dengan signifikan ( $p < 0.05$ ) pada minggu 1 (39.20%) dan menurun semula tetapi tidak signifikan ( $p > 0.05$ ) pada minggu ke 2 (38.67%). Pada minggu ke 3, nilai MI adalah 43.77% dan didapati merupakan nilai MI tertinggi yang direkodkan bagi sel akar *Dianthus caryophyllus* di dalam kultur *in vitro*. Pada minggu ke 4, 5, 6, 7 dan 8 nilai MI didapati menurun semula tetapi tidak signifikan ( $p > 0.05$ ). Selepas 3 bulan di dalam kultur, nilai MI didapati semakin menurun dengan signifikan ( $p < 0.05$ ) iaitu 31.83%, 34.45% selepas 4 bulan dan 33.17% selepas 6 bulan dikultur. Dengan keputusan ini, penentuan masa penggandaan sel (Cdt) *in vitro* telah dibuat berdasarkan kepada hari di mana nilai MI adalah tertinggi, iaitu 43.77% pada usia akar 3 minggu selepas dikultur.

#### 4.3.2 Bilangan Kromosom

Bilangan kromosom carnation yang dikultur secara *in vitro* menunjukkan julat nilai di antara 25-33 (Plat 4A, 4B). Sehari selepas dikultur, didapati purata bilangan kromosom carnation adalah 29.4 dan hampir sama dengan nilai bilangan kromosom tumbuhan carnation yang ditanam secara *in vivo* iaitu 29.7. Purata bilangan kromosom didapati menurun sedikit dengan tidak signifikan ( $p > 0.05$ ) pada hari kedua menjadi 28.9 dan 29.7 pada hari ketiga. Selepas empat hari dikultur, purata bilangan

**Jadual 7** : Purata indeks mitosis (MI) akar *Dianthus caryophyllus* yang dikultur secara *in vitro* di atas media MS yang ditambah dengan 2.0 mg/l NAA pada suhu  $25 \pm 1^\circ \text{C}$  dan kala cahaya 16 jam cahaya serta 8 jam gelap.

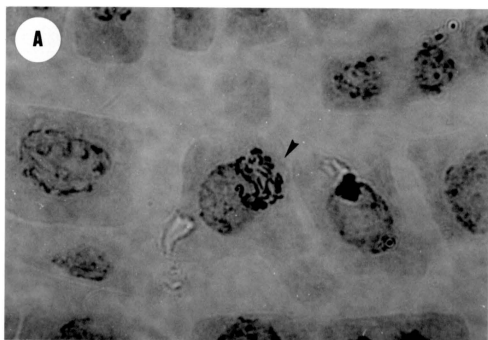
Hari di dalam kultur	Indeks Mitosis (%)
Akar <i>in vivo</i>	43.51 $\pm$ 2.14
1	41.20 $\pm$ 0.79
2	40.23 $\pm$ 1.30
3	37.35 $\pm$ 0.40
4	32.32 $\pm$ 1.55
7	39.20 $\pm$ 1.54
14	38.67 $\pm$ 1.35
21	43.77 $\pm$ 2.33
28	38.62 $\pm$ 1.75
35	38.20 $\pm$ 3.24
42	37.31 $\pm$ 1.27
49	37.69 $\pm$ 0.66
56	38.29 $\pm$ 1.87
3 bulan	31.83 $\pm$ 0.81
4 bulan	34.45 $\pm$ 0.70
6 bulan	33.17 $\pm$ 0.78

**Jadual 8** : Purata bilangan dan julat kromosom bagi sel-sel akar *Dianthus caryophyllus* yang dikultur secara *in vitro*. Sekurang-kurangnya 15 sel pada peringkat metafasa telah dikira pada setiap usia akar selepas dikultur.

Hari di dalam kultur	Purata bilangan kromosom	Julat bilangan kromosom
Akar <i>in vivo</i>	29.73 ± 0.12	29-30
1	29.40 ± 0.31	26-30
2	28.87 ± 0.29	27-30
3	29.67 ± 0.16	28-30
4	29.00 ± 0.48	27-33
7	29.47 ± 0.40	27-33
14	29.87 ± 0.24	28-31
21	29.93 ± 0.42	27-33
28	29.53 ± 0.51	27-33
35	28.80 ± 0.39	27-32
42	28.73 ± 0.44	25-30
49	28.67 ± 0.36	26-30
56	27.93 ± 0.43	25-30
3 bulan	28.27 ± 0.60	27-30
4 bulan	28.31 ± 0.69	26-30
6 bulan	29.00 ± 0.60	27-30



- PLAT 4** Sel-sel akar carnation pada peringkat metafasa selapas 7 hari dikultur di atas media MS yang ditambah dengan 2.0 mg/l NAA menunjukkan:
- a) 27 kromosom
  - b) 33 kromosom



kromosom sel carnation yang ditanam secara *in vitro* adalah 29.0. Selepas 1, 2, 3 dan 4 minggu di dalam kultur, purata bilangan kromosomnya, menunjukkan tiada perbezaan yang signifikan ( $p>0.05$ ) iaitu 29.5, 28.7, 28.7 dan 27.9. Bilangan kromosom selepas 3, 4 dan 6 bulan dikultur juga tidak berbeza dengan signifikan ( $p>0.05$ ) iaitu 28.3, 28.3 dan 29. Keputusan kajian ini ditunjukkan di dalam Jadual 8 (m.s. 91).

### 4.3.3 Luas Sel dan Luas Nukleus *Dianthus caryophyllus* cv. Grenadin Yang Dikultur Secara *in vitro*

#### Purata Luas Sel

Daripada pemerhatian yang dijalankan didapati purata luas sel profasa bagi sel-sel akar carnation yang dikultur di atas media MS yang ditambah dengan 2 mg/l NAA berubah-ubah dalam masa 6 bulan eksperimen dijalankan. Purata luas sel yang terkecil adalah  $83.27 \pm 0.31\mu\text{m}^2$  iaitu selepas 3 minggu dikultur (Rajah 7a App II) dan nilai terbesar pula adalah  $181.48 \pm 0.49\mu\text{m}^2$  iaitu selepas 1 minggu dikultur (Rajah 5a App II).

Luas sel didapati meningkat dengan signifikan ( $p<0.05$ ) selepas 1 hari dikultur, iaitu  $142.9 \pm 0.59\mu\text{m}^2$  bagi sel akar primer *in vivo* (Rajah 1 m.s. 71) dan  $165.15 \pm 0.58\mu\text{m}^2$  selepas 1 hari dikultur (Rajah 1a App II) tetapi turun dengan signifikan ( $p<0.05$ ) pada

hari ke 2 ( $124.73 \pm 0.49\mu\text{m}^2$ ) (Rajah 2a App II). Luas sel didapati berubah-ubah sehinggalah pada minggu ke 3 selepas dikultur, luas sel yang didapati cuma  $83.27 \pm 0.31\mu\text{m}^2$  (Rajah 71 App II). Nilai ini meningkat semula pada 4, 5, 6, 7, 8 dan 12 minggu selepas dikultur dan kemudiannya menurun semula selepas 4 dan 6 bulan dikultur (Rajah 8a, 9a, 10a, 11a, 12a, 13a, 14a, 15a App II).

### **Purata Luas Nukleus**

Perubahan luas nukleus didapati berkadar terus dengan nilai luas sel di mana semakin besar nilai luas selnya maka semakin besar juga nilai luas nukleusnya. Luas nukleus terkecil adalah selepas 3 minggu dikultur iaitu  $17.66 \pm 0.06\mu\text{m}^2$  (Rajah 7b App II) dan luas sel terbesar adalah  $43.95 \pm 0.28\mu\text{m}^2$  (Rajah 5b App II) iaitu selepas 1 minggu dikultur. Nisbah purata luas nukleus / luas sel adalah 0.24. Semua data bagi eksperimen ini ditunjukkan di dalam Jadual 9 (m.s. 96) dan Apendiks II.

#### **4.3.4 Kandungan DNA Nukleus dan Penentuan Tahap Ploidi *Dianthus caryophyllus* cv. Grenadin Yang Dikultur Secara *in vitro*.**

Secara umumnya didapati taburan kandungan DNA nukleus bagi sel-sel akar *D.caryophyllus* yang dikultur secara *in vitro* di atas media MS yang ditambah dengan 2mg/l NAA menunjukkan peratus sel poliploid yang tinggi dengan kandungan DNA nukleusnya lebih daripada 4.8C.

**Jadual 9** : Purata nilai luas sel dan luas nukleus bagi sel-sel akar carnation yang dikultur secara *in vitro* di atas media MS yang ditambah dengan 2.0 mg/l NAA.

Perlakuan	Purata luas sel, $\mu\text{m}^2$	Purata luas nukleus, $\mu\text{m}^2$	Nisbah luas nukleus/luas sel
<i>In vivo</i>			
4 hari	142.90 $\pm$ 0.59	26.59 $\pm$ 0.09	0.19
<i>In vitro</i>			
1 hari	165.05 $\pm$ 0.58	35.66 $\pm$ 0.10	0.22
2 hari	124.73 $\pm$ 0.44	30.34 $\pm$ 0.09	0.24
3 hari	153.06 $\pm$ 0.48	42.37 $\pm$ 0.12	0.28
4 hari	118.94 $\pm$ 0.04	32.30 $\pm$ 0.08	0.27
7 hari	181.48 $\pm$ 0.49	43.95 $\pm$ 0.28	0.24
14 hari	145.58 $\pm$ 0.56	29.64 $\pm$ 0.11	0.20
21 hari	83.27 $\pm$ 0.31	17.66 $\pm$ 0.06	0.21
28 hari	106.57 $\pm$ 0.30	33.03 $\pm$ 0.10	0.31
35 hari	129.92 $\pm$ 0.54	30.48 $\pm$ 0.11	0.23
42 hari	131.28 $\pm$ 0.56	25.95 $\pm$ 0.09	0.20
49 hari	142.23 $\pm$ 0.59	38.21 $\pm$ 0.12	0.27
56 hari	143.38 $\pm$ 0.54	30.23 $\pm$ 0.10	0.21
3 bulan	157.14 $\pm$ 0.60	36.50 $\pm$ 0.12	0.23
4 bulan	153.14 $\pm$ 0.61	36.88 $\pm$ 0.12	0.24
6 bulan	105.27 $\pm$ 0.44	24.53 $\pm$ 0.09	0.23

Didapati sehari selepas diletakkan di atas media kultur, 100% sel adalah poliploid. Namun begitu peratus sel poliploid menurun dan berbeza dengan signifikan ( $p < 0.05$ ) pada hari ke 2 iaitu 61.64%. Peratus sel poliploid terendah yang didapati adalah 42.67% iaitu selepas 2 bulan dikultur dan peratusan tertinggi adalah 100% iaitu sehari selepas kultur.

Peratus sel yang berada pada fasa G1 adalah paling rendah apabila dikultur secara *in vitro*. Tiada sel yang berada pada fasa G1 ini pada 1, 2, 3 dan 4 hari, 1, 2, 3, 4 dan 5 minggu serta 2, 3 dan 6 bulan selepas dikultur. Cuma 1.32% sel berada pada fasa G1 ini selepas 2 dan 6 minggu dikultur.

Peratus sel yang berada pada fasa S juga adalah rendah iaitu di antara 0 - 18.75% sahaja. Tiada sel yang berada pada fasa ini selepas 1 hari dikultur. Nilai ini meningkat dengan signifikan ( $p < 0.05$ ) pada hari ke 2 iaitu 11.32% dan nilai ini berubah-ubah sehingga 6 bulan dikultur. Nilai peratus sel pada fasa S yang tertinggi adalah 17.53% iaitu pada minggu ke 2 dan 18.75% selepas 6 bulan dikultur.

Berbanding peratus fasa G1 dan S, peratus sel yang berada pada fasa G2 didapati agak tinggi iaitu di antara 0 - 43.33%. Tiada sel yang berada pada fasa G1 selepas 1 hari dikultur. Nilai ini berubah-ubah dan peratusan tertinggi yang didapati adalah 43.33% iaitu selepas 2 bulan dikultur. Semua data yang didapati ditunjukkan dalam Jadual 10.

**Jadual 10** : Taburan kandungan DNA nukleus bagi sel-sel akar carnation yang dikultur secara *in vitro* di atas media MS yang ditambah dengan 2.0mg/l NAA.

Perlakuan	G1(%) 0-2.2C	S(%) 2.2-3.6C	G2(%) 3.6-4.8C	Poliploid(%) >4.8C
<i>In vivo</i>				
4 hari	0.00	1.32	3.95	94.74
<i>In vitro</i>				
1 hari	0.00	0.00	0.00	100
2 hari	0.00	11.32	27.04	61.64
3 hari	0.00	0.67	36.00	63.33
4 hari	0.00	3.27	9.15	87.58
7 hari	0.00	2.01	22.82	75.17
14 hari	1.30	17.63	20.78	60.39
21 hari	0.00	11.04	21.43	67.53
28 hari	0.00	1.42	3.55	95.04
35 hari	0.00	9.09	19.58	71.33
42 hari	1.32	3.97	9.27	85.43
49 hari	0.67	12.67	20.67	66.00
56 hari	0.00	14.00	43.33	42.67
3 bulan	0.00	6.08	13.51	80.41
4 bulan	0.68	0.68	4.73	93.92
6 bulan	0.00	18.75	10.42	70.83

#### 4.3.5 Masa Penggandaan Sel (Cdt) *in vitro*

Masa penggandaan sel (Cdt) bagi akar *Dianthus caryophyllus* yang dikultur secara *in vitro* dan berusia 3 minggu selepas dikultur didapati dengan memplotkan graf peratus frekuensi bagi metafasa melawan tempoh masa pendedahan akar kepada kolkisin. Darpada pengiraan yang dilakukan, didapati masa penggandaan sel (Cdt) bagi *Dianthus caryophyllus* cv. Grenadin yang dikultur secara *in vitro* adalah 96.07 jam. Keputusan eksperimen direkodkan di dalam Jadual 11 (m.s. 100) dan Graf 3 (m.s. 101). Dengan menggunakan formula Clowes (1961);

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

$m$  = kadar pengumpulan sel pada metafasa

= kecerunan graf

= 0.7215%/jam

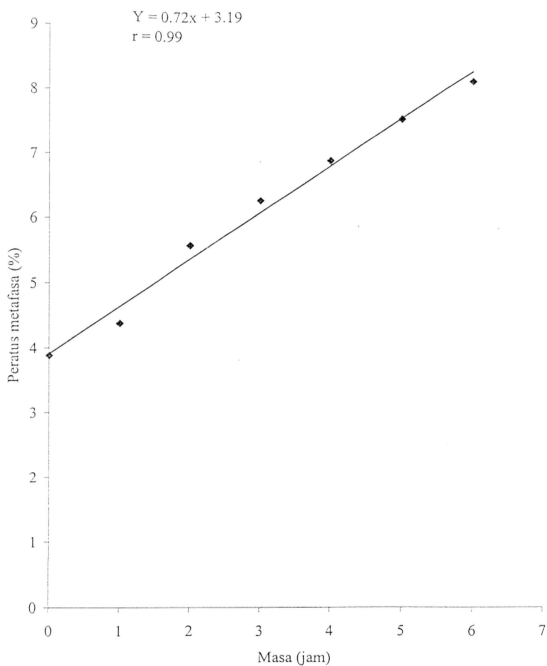
Oleh itu;

$$\begin{aligned} \text{Cdt } in vitro &= \frac{\ln 2}{0.7215\%} \\ &= 96.07 \text{ jam.} \end{aligned}$$



**Jadual 11** : Hubungan di antara peratus frekuensi profasa, metafasa dan indeks mitosis sel-sel akar *Dianthus caryophyllus* cv. Grenadin yang berusia 3 minggu dan dikultur secara *in vitro* di atas media MS yang ditambah dengan 2.0 mg/l NAA apabila didedahkan kepada 0.025% w/v kolkisin selama 6 jam.

Tempoh pendedahan kepada kolkisin	Peratus frekuensi (%) bagi		
	Profasa $\pm S_D$	Metafasa $\pm S_D$	Indeks mitosis $\pm S_E$
0	38.42 $\pm$ 4.85	3.88 $\pm$ 0.78	43.77 $\pm$ 2.33
1	38.26 $\pm$ 0.94	4.37 $\pm$ 0.50	-
2	38.01 $\pm$ 0.07	5.56 $\pm$ 0.04	-
3	38.48 $\pm$ 1.14	6.26 $\pm$ 0.12	-
4	38.08 $\pm$ 2.45	6.88 $\pm$ 0.60	-
5	38.23 $\pm$ 0.93	7.51 $\pm$ 0.39	-
6	38.09 $\pm$ 0.38	8.09 $\pm$ 0.53	-



**Graf 3** Perkaitan di antara peratus frekuensi metafasa dan tempoh pendedahan kepada 0.025% kolkisin bagi sel-sel akar *Dianthus caryophyllus* yang dikultur di atas media MS yang ditambah dengan 2.0mg/l NAA.

#### 4.4 RINGKASAN KEPUTUSAN

1. Secara amnya, nilai MI bagi *Dianthus caryophyllus* Linn. cv. Grenadin yang dikultur secara *in vitro* adalah lebih rendah berbanding *in vivo* dan nilai ini berubah-ubah sepanjang 6 bulan di dalam kultur. Nilai MI tertinggi yang didapati adalah pada minggu ke 3 di dalam kultur iaitu 43.77 % dan didapati nilai ini hampir sama dengan nilai MI bagi carnation yang ditanam secara *in vivo* iaitu 43.51%. Akar *D. caryophyllus* yang dikultur secara *in vitro* dan berusia 3 minggu ini telah digunakan untuk pengiraan Cdt.
2. Purata bilangan kromosom bagi sel-sel meristem akar *Dianthus caryophyllus* yang dikultur secara *in vitro* adalah stabil di sepanjang kultur. Bilangan kromosom carnation yang dikultur secara *in vitro* didapati hampir sama dengan bilangan kromosom bagi carnation yang ditanam secara *in vivo* ( $2n = 2x = 30$ ) dan julatnya adalah di antara 25 - 33.
3. Taburan kandungan DNA nukleus bagi *Dianthus caryophyllus* cv. Grenadin yang dikultur secara *in vitro* menunjukkan peratus sel-sel poliploidi dengan tahap ploidi  $>4.8C$  yang tinggi sepanjang 6 bulan eksperimen dijalankan. Tidak lebih daripada 1.3% sel carnation yang dikultur secara *in vitro* ini berada pada fasa G1 (0 -  $2.2C$ ), 0 - 18.75% pada fasa S ( $2.2 - 3.6C$ ), 0 -

43.33% pada fasa G2 (3.6 - 4.8C) dan 42.67 - 100% sel merupakan sel poliploid (>4.8C).

4. Perubahan luas nukleus *Dianthus caryophyllus* cv. Grenadin yang dikultur secara *in vitro* didapati berkadar terus dengan luas selnya di mana semakin besar nilai luas sel, maka semakin besar juga luas nukleusnya. Purata luas sel terbesar yang didapati ialah selepas 1 minggu dikultur iaitu  $181.48 \pm 0.49\mu\text{m}^2$  dan luas nukleusnya  $43.95 \pm 0.28\mu\text{m}^2$ . Purata luas sel terkecil pula adalah selepas 3 minggu dikultur iaitu  $83.27 \pm 0.49\mu\text{m}^2$  dan luas nukleusnya  $43.95 \pm 0.28\mu\text{m}^2$ . Purata luas sel terkecil pula adalah selepas 3 minggu dikultur iaitu  $83.27 \pm 0.31\mu\text{m}^2$  dan luas nukleusnya  $17.66 \pm 0.06\mu\text{m}^2$ .
  
5. Eksplan akar carnation yang dikultur secara *in vitro* menunjukkan Cdt yang lebih lama daripada akar primer tumbuhan 'intact'. Masa pengandaan sel carnation yang dikultur secara *in vitro* adalah 96.07 jam berbanding 66.11 jam di dalam *in vivo*.