

BAB 7

PERBINCANGAN

Pada permulaan kajian, satu eksperimen piawai bagi memerhatikan pertumbuhan akar berbanding dengan masa telah dijalankan. Biji benih telah dicambahkan di atas kapas basah yang steril pada suhu $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ serta diberi 16 jam cahaya dan 8 jam gelap selama 10 hari. Eksperimen piauan ini telah dijalankan bertujuan untuk mendapatkan satu nilai piawai untuk kepanjangan akar primer dan umur yang paling optima untuk kegunaan eksperimen yang selanjutnya. Kajian ini juga bertujuan untuk mengurangkan variasi di antara sampel-sampel akar primer dengan menentukan usia akar primer yang paling maksima sebelum akar sekunder muncul. Dengan ini semua eksperimen yang selanjutnya akan menggunakan sampel akar yang mempunyai umur dan kepanjangan yang sama, seragam dan variasi di antara akar-akar adalah paling minima.

Biji benih *Z. elegans* terdiri dari tiga bahagian utama iaitu embrio yang akan berkembang menjadi tumbuhan lengkap, bahan simpanan makanan yang terdapat di dalam kotiledon dan endosperma di mana penting untuk membekalkan makanan kepada embrio bila ia membesar dan kulit biji atau dipanggil testa. Embrio *Z. elegans* yang matang terdiri dari dua kotiledon, satu plumul dan satu hipokotil. Percambahan biji benih *Z. elegans* berlaku apabila nutrien-nutrien yang tersimpan di dalam kotiledon dibekalkan kepada embrio. Embrio akan berkembang mengakibatkan pemecahan testa dan kemunculan anak pokok

berlaku. Pembekalan nutrien ini akan berterusan sehingga pucuk keluar dan berupaya menjalankan proses fotosintesisnya sendiri. Terdapat dua jenis percambahan biji benih iaitu epigeal dan hipogeal. Percambahan secara epigeal berlaku apabila kotiledon yang terdapat pada biji terangkat ke atas dari permukaan tanah manakala percambahan secara hipogeal berlaku apabila kotiledon tertinggal di dalam tanah dan hanya plumul saja yang muncul di atas tanah. Berdasarkan kajian yang telah dijalankan didapati anak cambah *Zinnia elegans* Jacq. mempunyai percambahan jenis epigeal iaitu kotiledon yang terdapat pada biji benih terangkat ke atas dari permukaan tanah atau media percambahan dengan peratus percambahan 95%.

Perkembangan dan pertumbuhan bahagian akar dan pucuk seperti plumul, hipokotil, epikotil dan radikel adalah melalui proses pembahagian dan pembesaran sel. Pada masa ini bahan simpanan makanan akan berkurangan kerana telah dipindahkan kepada tisu-tisu tumbuhan terutamanya di bahagian meristem iaitu hujung pucuk dan akar. Kulit biji akan pecah kerana bahagian pucuk dan daun hijau akan muncul untuk menjalankan proses fotosintesis. Ketika ini juga akar akan muncul keluar dari bahagian embrio iaitu radikel dan mula menyerap air sebagai bekalan kepada daun-daun yang baru tumbuh. Akar adalah heterotrofik dan bergantung kepada sumber karbohidrat, vitamin dan hormon di mana kesemua sumber-sumber ini akan diangkut oleh akar ke bahagian pucuk yang boleh menjalani fotosintesis. Kehadiran akar sekunder akan mengganggu proses tumbesaran akar primer ini. Oleh kerana itu pertumbuhan akar sekunder tidak diperlukan dalam kajian ini dan hanya difokuskan kepada akar primer sahaja. Di dalam kajian ini didapati akar sekunder *Z. elegans* muncul pada hari keenam.

Percambahan biji benih *Zinnia elegans* Jacq. berlaku pada hari kedua dengan kemunculan radikel yang akan membentuk akar primer di mana ia terletak dibahagian bawah hipokotil. Ini diikuti dengan kemunculan plumul yang terletak di atas kotiledon. Plumul mempunyai meristem serta beberapa daun yang rudimen yang bakal menjadi daun. Akar sekunder kebanyakannya muncul pada hari keenam. Kehadiran akar sekunder ini akan merencatkan pertumbuhan akar primer. Oleh kerana itu penggunaan akar primer yang berusia 5 hari tanpa kehadiran akar sekunder telah digunakan untuk mengelakkan variasi di antara sampel akar yang akan digunakan untuk eksperimen yang berikutnya. Kemunculan akar sekunder tidak diingini kerana kajian dibataskan kepada aktiviti akar primer sahaja.

Pemanjangan akar primer yang optima berlaku pada hari kelima dengan purata pemanjangan akar $40.82 \pm 15.39\text{mm}$ atau 9.7mm/hari (Rajah 2.1). Persamaan regresi yang diperolehi adalah $Y = 9.71x - 6.59$ dengan koefisien korelasi $r = 0.99$. Dengan ini julat purata pemanjangan akar yang akan digunakan untuk kajian seterusnya adalah di antara $25.43 - 56.21\text{mm}$. Tiap-tiap spesies tumbuhan mempunyai julat purata kepanjangan akar primer yang berbeza. Sebagai contoh *Petunia hybrida*, kepanjangan akar primer yang optima berlaku pada hari kelima dengan purata pemanjangan akar $3.47 \pm 1.62\text{mm}$ atau 0.80mm/hari . Julat purata kepanjangan akar primer adalah di antara $1.85 - 5.09\text{mm}$ (Abdullah, 1998). Manakala bagi *Psophocarpus tetragonolobus*, kepanjangan akar primer yang optima berlaku pada hari kelima juga dengan purata kepanjangan akar $26.13 \pm 2.14\text{mm}$ atau 6.18 mm/hari . Julat purata kepanjangan akar adalah di antara $23.99 - 28.27\text{mm}$ (Abu Shah dan Taha, 1994). Dengan julat kepanjangan ini variasi antara sel akar yang memasuki fasa S dan mitosis dapat dikurangkan

(Jakob dan Bovey, 1969). Ini kerana terdapatnya korelasi yang kuat antara panjang akar dengan indeks pelabelan (LI) dan indeks mitosis (MI) (Bryant, 1969). Dengan memilih akar yang mempunyai populasi sel dan tumbesaran yang seragam, kadar aberasi pada LI dan MI dapat dikurangkan serta peratus populasi sel yang memasuki fasa mitosis dari fasa G1 juga seragam dan teratur (Thomas dan Davidson, 1981). Berdasarkan kepada faktor-faktor inilah hanya akar yang mempunyai julat kepanjangan 25.43 - 56.21mm sahaja yang boleh digunakan untuk kajian sitologi ke atas meristem akar dari sistem *in vivo* dan *in vitro* seperti penentuan nilai MI, bilangan kromosom, penentuan kandungan DNA nukleus, purata luas sel dan nukleus serta masa penggandaan sel (Cdt)

Bagi *Rosa hybrida* L. var 'Christian Dior' pula, eksperimen piawaian bagi pertumbuhan akar berbanding dengan masa tidak dapat dilakukan kerana tiada pembentukan akar yang berlaku pada semua eksplan yang dikultur dan kesukaran untuk mendapatkan biji benih hibrid yang terpaksa diimport serta masalah kedormanan biji benih *R. hybrida*. Untuk memecahkan kedormanan biji benih ini, ia perlu disimpan di dalam bilik sejuk yang bersuhu 4°C selama 3 hingga 4 minggu. Setelah itu biji benih ini perlu dipindahkan ke dalam bilik bersuhu 18 - 21°C selama 2 hingga 3 minggu untuk percambahan sepenuhnya. Tambahan pula biji benih yang banyak diperlukan tetapi bagi spesies ini, biji benih sangat terhad. Oleh itu eksperimen piawaian seperti dalam *Z. elegans* tidak dapat dijalankan. Disebabkan oleh masalah ini, kajian kepanjangan akar primer *Rosa hybrida* tidak dapat dijalankan. Kajian-kajian lain yang berkaitan dengan aktiviti sel seperti indeks mitosis, bilangan kromosom, kandungan DNA nukleus, purata luas sel dan nukleus serta masa penggandaan sel juga tidak dapat dilakukan bagi kedua-dua

keadaan *in vivo* dan *in vitro* bagi spesies ini walaupun pada awalnya ada rancangan untuk kajian yang sama seperti *Z.elegans* dilakukan terhadap *Rosa hybrida*.

Antara objektif kajian sitologi atau kajian aktiviti sel adalah bertujuan untuk mengetahui samada sesuatu kultur sel atau tumbuhan yang diregenerasikan adalah stabil dan normal. Kajian ini juga sangat berguna untuk menganalisis samada berlaku sebarang perubahan pada bilangan kromosom seperti aneuploid dan poliploid pada sesuatu kultur tisu tumbuhan. Ini kerana didapati frekuensi untuk berlakunya ketidakstabilan kromosom adalah tinggi pada tumbuhan yang diregenerasikan melalui teknik kultur tisu. Di dalam kebanyakan tisu tumbuhan dan haiwan, kadar pembahagian bagi sesuatu populasi sel adalah berbeza di antara satu spesies dengan spesies yang lain (Evans dan Reed, 1981).

Oleh itu kajian sitologi ke atas akar primer *in vivo* *Z. elegans* dilakukan untuk mengkaji aktiviti dan kelakuan sel. Juga bertujuan untuk mendapatkan suatu nilai piawai untuk dibuat perbandingan dengan aktiviti sel tumbuhan yang diregenerasikan melalui kultur *in vitro*. Justeru itu parameter-parameter seperti indeks mitosis (MI), bilangan kromosom, kandungan DNA nukleus, purata luas sel dan nukleus serta masa penggandaan sel (Cdt) telah dijalankan untuk digunakan sebagai suatu eksperimen piawai dan sebagai data asas kepada spesies ini dalam keadaan *in vivo*. Sebarang perubahan kepada nilai-nilai parameter ini boleh dijadikan petunjuk sekiranya ada ketidaknormalan telah berlaku atau sel-sel tumbuhan telah berubah dari segi tahap nukleus atau selular. Selalunya perubahan

pada tahap nuklear atau selular akan dipengaruhi perubahan dari segi morfologi dan bentuk pokok.

Daripada kajian yang telah dijalankan didapati nilai purata indeks mitosis (MI) bagi sel akar primer *Z. elegans* yang ditanam secara *in vivo* adalah $13.47 \pm 0.46\%$ (Jadual 3.1). Jika dibandingkan dengan *Petunia hybrida*, nilai indeks mitosisnya adalah $11.63 \pm 0.26\%$ (Abdullah, 1998) manakala *Vicia faba* pula nilai indeks mitosisnya adalah $13.82 \pm 2.41\%$ (Taha, 1989) dan nilai ini didapati hampir sama. Tetapi jika dibandingkan dengan spesies-spesies lain seperti *Pisum sativum* ($6.47 \pm 1.49\%$), *Allium cepa* ($6.38 \pm 2.18\%$) dan *Zea mays* ($9.52 \pm 1.05\%$) (Seyed Mozaffari dan Gahan, 1978) nilai ini didapati lebih tinggi. Ini menunjukkan setiap spesies tumbuhan mempunyai nilai MI yang berbeza dan tersendiri iaitu populasi selnya mengambil masa yang berbeza untuk menggandakan populasinya.

Segmen hujung akar primer dengan kepanjangan 2mm telah digunakan kerana segmen ini adalah kawasan yang paling aktif membahagi. Phillips dan Torrey (1972) mendapati indeks mitosis (MI) bagi setiap bahagian zon meristem akar adalah berlainan. Nilai indeks mitosis (MI) ini didapati semakin meningkat dengan bertambahnya jarak daripada apeks akar (Dewey dan Howard, 1963). Didapati kawasan yang melebihi dari 5mm dari hujung akar mempunyai sel-sel yang tidak aktif membahagi kerana kebanyakan daripada sel-sel ini berada pada fasa pembezaan (Deeley *et al.*, 1957; Woodard *et al.*, 1961).

Purata bilangan kromosom yang diperolehi daripada sel akar primer *Z. elegans* yang telah ditanam secara *in vivo* adalah 22.9 dengan julat di antara 18-28 (Jadual 3.1, Plat 3.1). Nilai 22.9 ini menghampiri nilai 23 iaitu jumlah bilangan kromosom yang sebenar $2n=23$ seperti yang telah dilaporkan oleh Terry-Lewandowski *et al.* (1984). Variasi pada bilangan kromosom boleh berlaku pada tumbuhan 'intact' tetapi kadar variasi ini selalunya lebih tinggi pada kultur *in vitro* (Heinz dan Mee, 1971).

Mitosis adalah proses pembahagian sel di mana kromatid setiap kromosom di dalam sesuatu genom berpisah. Pembahagian mitosis juga melibatkan replikasi maklumat keturunan di dalam DNA. Dengan ini bilangan kromatid yang sama juga akan wujud pada setiap sel anak tetapi saiz sel anak adalah lebih kecil daripada sel induk. Proses replikasi maklumat bukan sahaja berlaku pada permulaan mitosis tetapi juga pada permulan interfasa. (Swift, 1950) Interfasa merupakan satu fasa di mana aktiviti metabolismik berlaku dengan giat di dalam nukleus. Ketika ini nukleus terlibat di dalam proses sintesis protein dan replikasi kromosom. Interfasa mempunyai 3 fasa lagi iaitu fasa prasintesis DNA (G1) iaitu fasa pembesaran sel, fasa replikasi DNA (S) iaitu fasa di mana kandungan DNA digandakan. Fasa terakhir adalah fasa G2 iaitu fasa selepas sintesis DNA. Kitaran sel-sel ini bermula dengan fasa G1, S dan G2 di mana akhirnya sel-sel ini akan memasuki mitosis semula dan keseluruhan proses ini dipanggil kitaran sel (Howard dan Pelc, 1953).

Pada fasa G1 nukleus akan mempunyai kandungan DNA sebanyak $2C$. $1C$ adalah merujuk kepada kuantiti DNA yang belum bereplikasi di dalam genom

haploid sesuatu gamet. Fasa prasintesis DNA atau G₁ ini adalah satu fasa persediaan untuk fasa S. Pada ketika ini sel-sel akan melakukan sintesis RNA dan protein. Pada fasa S pula sintesis RNA dan protein masih lagi diteruskan disertai dengan sintesis DNA dan pembentukan histon. Pada penghujung fasa S kandungan DNA adalah 4C iaitu dari sel-sel diploid (2C) yang terdapat pada permulaan fasa S (Van't Hof, 1985). Pada fasa G₂ pula tiada lagi sintesis DNA berlaku dan tiada lagi sintesis RNA dan protein berlaku. Kandungan DNA pula adalah 4C.

Berdasarkan Jadual 3.2 dan Rajah 3.2, taburan kandungan DNA nukleus di dalam sel-sel akar primer *Z. elegans* yang telah ditanam secara *in vivo* menunjukkan kebanyakan sel-sel berada pada fasa G₂ iaitu fasa selepas sintesis DNA (55.62%). Ini diikuti oleh fasa S (14.37%) dan tiada sebarang sel yang berada pada fasa G₁(0%). Terdapat sebanyak 33.75% daripada sel-sel ini yang menunjukkan poliploid iaitu sel-sel yang mempunyai kandungan DNA nukleus melebihi 4.8C.

Sel-sel tumbuhan yang normal biasanya adalah diploid atau mempunyai kandungan DNA nukleus di antara 2C hingga 4C, tetapi di dalam sel-sel akar primer *Z. elegans* *in vivo*, pengukuran kandungan DNA nukleus menunjukkan terdapatnya kehadiran poliploid sebanyak 33.75%. Ini adalah kerana biji benih *Z. elegans* yang digunakan dalam kajian ini adalah jenis hibrid. Bilangan kromosom yang sebenar bagi tumbuhan induk *Z. elegans* adalah 2n=24. Manakala bagi jenis hibrid atau kacukan interspesifik bilangan kromosomnya adalah 2n=23. Disebabkan faktor hibrid atau kacukan interspesifik ini maka terdapatnya

kehadiran sel-sel poliploid di dalam sel akar primer *Z. elegans*. Keadaan poliploid ini hanya akan kelihatan pada peringkat genotip sahaja dan bukannya pada peringkat fenotip (Terry-Lewandowski *et al.*, 1984).

Berdasarkan kepada keputusan dari pengukuran kandungan DNA nukleus terhadap sel akar primer *Z. elegans* yang telah ditanam secara *in vivo* (Jadual 3.2), didapati 55.62% daripada sel-sel ini berada pada fasa G2 dan 14.37% lagi pada fasa S. Ini menunjukkan terdapat sebahagian daripada sel-sel ini yang belum melalui proses mitosis dan ada sebahagian daripada sel-sel ini yang sedang dan telah menjalani proses replikasi DNA. Tidak terdapat sebarang sel yang telah menjalani proses mitosis untuk memasuki proses sintesis DNA. Woodard *et al.* (1961) serta Evans dan Van't Hof (1974) mendapati sel yang berehat pada fasa G2 mempunyai kaitan yang rapat dengan pembezaan tisu. Ini bermaksud sekiranya lebih banyak sel yang berada pada fasa G2, maka lebih banyak sel-sel yang membeza membentuk tisu-tisu yang matang atau lebih banyak sel-sel yang berada pada fasa pembezaan.

Pada tumbuhan, pembezaan selalunya tertumpu pada bahagian akar dan pucuk. Sel-sel akan melengkapkan pembahagiannya sehingga ke fasa G1 manakala sebahagian daripada sel yang lain akan melengkapkan pembahagiannya sehingga ke fasa G2. Apabila selesai proses pembahagian, sel-sel akan memasuki proses tumbesaran dan pemanjangan. Pada peringkat ini sel-sel akan bertambah dari segi isipadu dan akan mensintesis protein serta DNA nukleus. Fenomena ini akan membawa kepada pertambahan tahap ploidi dan dipanggil endoreduplikasi (Sebanek, 1992).

Dari jadual 3.3 didapati purata luas sel akar *Z. elegans* yang telah ditanam secara *in vivo* adalah $113.55 \pm 4.44\mu\text{m}^2$ (Rajah 3.3) dan purata luas nukleus ialah $40.58 \pm 0.95\mu\text{m}^2$ (Rajah 3.4). Manakala nisbah luas nukleus kepada sel ialah 0.39. Adalah sukar untuk dibuat perbandingan kerana tidak terdapat kajian terdahulu dan terkini berkaitan aktiviti sel ke atas *Z. elegans* atau spesies dari famili yang sama. Ini adalah kajian pertama yang melibatkan pengukuran parameter purata luas sel dan nukleus. Kajian-kajian lain yang terdapat melibatkan spesies-spesies seperti *Petunia hybrida* dan *Psophocarpus tetragonolobus*. Keputusan yang didapati bagi *P. hybrida* untuk purata luas sel akar yang telah ditanam secara *in vivo* adalah $113.72 \pm 3.82 \mu\text{m}^2$ dan untuk purata luas nukleus pula adalah $35.55 \pm 1.83\mu\text{m}^2$. Manakala nisbah luas nukleus kepada sel adalah 0.30 (Abdullah, 1998). Untuk *Psophocarpus tetragonolobus* pula keputusan yang didapati untuk purata luas sel akar yang telah ditanam secara *in vivo* adalah $359.53 \pm 17.86\mu\text{m}^2$ dan untuk purata luas nukleus pula adalah $115.98 \pm 2.53\mu\text{m}^2$. Manakala nisbah luas nukleus kepada sel adalah 0.32 (Abu Shah dan Taha, 1994). Jika dibuat perbandingan nilai-nilai untuk ketiga-tiga spesies tumbuhan ini, tiada sebarang perbezaan yang ketara didapati.

Masa yang diambil untuk sel akar *Z. elegans* yang telah ditanam secara *in vivo* untuk menggandakan bilangan populasi selnya adalah 133 jam (Jadual 3.1, Rajah 3.1). Keputusan ini menunjukkan masa yang diperlukan oleh satu populasi sel anak untuk mensintesis sitoplasma, organel-organel serta untuk pengembangan isipadu nukleus dan saiz sel sebelum memasuki proses mitosis untuk fasa pembahagian bagi membentuk sel-sel yang baru sebanyak 2 kali ganda daripada populasi asalnya dan mengambil masa selama 133 jam.

Jika dibuat perbandingan dengan spesies-spesies lain, masa penggandaan sel yang diperlukan oleh *Zea mays* adalah 12 jam sahaja bagi bahagian hujung akar dan 239 jam bagi bahagian pusat kuisen akar (Clowes, 1961). Dalam kajian yang sama juga Barlow (1969) mendapatkan masa penggandaan sel yang diperlukan oleh *Zea mays* adalah 14 jam bagi bahagian hujung akar dan 370 jam bagi bahagian pusat kuisen akar. Bagi *Petunia hybrida* pula masa penggandaan sel adalah selama 32.02 jam (Abdullah, 1998) dan *Psophocarpus tetragonolobus* selama 28 jam (Abu Shah dan Taha, 1994). Ini menunjukkan setiap spesies tumbuhan mempunyai masa penggandaan sel yang berbeza-beza bergantung kepada keaktifan sel-sel untuk menggandakan populasinya.

Masa penggandaan sel (Cdt) adalah bergantung kepada faktor-faktor seperti suhu dan jarak hujung akar yang diambil untuk dibuat sampel. Sebagai contoh Hejnowicz (1959) di dalam kajiannya ke atas *Triticum sp.* mendapatkan masa penggandaan sel yang diambil untuk sampel akar pada jarak 0.15mm dari hujung akar ialah 21 jam manakala pada jarak 0.9mm masa penggandaan sel adalah 60 jam.

Clowes (1961) mendapatkan masa penggandaan sel pada lapisan pertama hujung akar *Zea mays* adalah 12 jam, pada lapisan kedua 239 jam dan pada lapisan ketiga 48-55 jam. Evans dan Savage (1959) pula memperolehi masa penggandaan sel bagi *Vicia faba* pada suhu 19°C adalah 26 jam dan pada suhu 25°C selama 23 jam. Dalam kajian yang telah dilakukan, sampel akar diambil 2mm dari hujung akar pada suhu 25°C.

Dalam kajian ini, kaedah kultur tisu telah dijalankan ke atas 2 spesies tumbuhan hiasan iaitu *Z. elegans* Jacq. dan *Rosa hybrida* L. var ‘Christian Dior’ adalah bertujuan untuk mengkaji aspek-aspek yang berkaitan morfogenesis dan organogenesis. Di dalam kajian kultur tisu setiap eksplan atau bahagian tanaman seperti pucuk, daun, akar, batang, petiol dan sebagainya mempunyai keupayaan untuk regenerasi (Staba, 1980). Keupayaan setiap eksplan untuk membentuk satu individu yang lengkap banyak bergantung kepada kombinasi hormon auksin dan sitokinin yang sesuai pada media yang optima. Faktor-faktor lain seperti sumber karbon dan tenaga, formulasi media, pH media, saiz eksplan, sumber eksplan, umur fisiologi eksplan, polariti eksplan, cahaya, kala cahaya, keamatan cahaya, dan suhu turut mempengaruhi kejayaan sesuatu kajian kultur tisu untuk mendapat regenerasi lengkap tumbuhan.

Berdasarkan kajian-kajian terdahulu dan terkini, kajian kultur tisu ke atas tanaman hiasan *Z. elegans* hanya menggunakan media asas Murashige dan Skoog (1962). Formulasi media ini didapati terbaik untuk kajian kultur tisu ke atas tumbuhan hiasan kerana komposisi nitrat, kalium dan ammonianya yang tinggi (Murashige dan Skoog, 1962). Sumber karbon dan tenaga yang utama adalah sukrosa dengan kepekatannya 30g/l (Takayama dan Misawa, 1979). Sukrosa didapati mempunyai kandungan karbohidrat yang tinggi dan mencukupi untuk tumbuhan berbanding dengan glukosa dan fruktosa (Conger, 1981).

Sebanyak 8g/l agar telah digunakan kerana didapati kadar yang melebihi 8g/l boleh mengganggu proses osmosis dan mengurangkan keberkesanan penyerapan nutrien dan sebatian organik oleh tisu atau eksplan tumbuhan

(Murashige dan Skoog, 1962; Hughes, 1981 dan Pierik, 1987). pH media pula adalah perlu di antara 5.6 hingga 5.8 kerana julat ini didapati sesuai untuk penyerapan nutrien dan menggalakkan pertumbuhan (Hughes, 1981). pH yang rendah dari 4.5 atau lebih dari 7.0 didapati boleh menyebabkan pertumbuhan dan perkembangan tumbuhan di dalam sistem kultur *in vitro* terencat. Ia juga menyebabkan kandungan nutrien di dalam media berada di dalam keadaan tidak tersedia serta menyebabkan sukrosa bertukar menjadi glukosa dan fruktosa selepas diautoklaf (Conger, 1981).

Hormon pengawalatur tumbesaran tumbuhan yang telah digunakan untuk kajian kultur tisu ke atas *Z. elegans* adalah 2,4-D, NAA, IBA dan IAA untuk auksin. Manakala untuk sitokinin hormon yang digunakan ialah BAP, Kinetin, TDZ dan Zeatin. Kesemua kombinasi hormon auksin dan sitokinin ini adalah berdasarkan kajian-kajian terdahulu ke atas famili Compositae. Ini kerana kajian kultur tisu ke atas *Z. elegans* adalah yang pertama dilakukan dan sehingga kini tidak terdapat kajian-kajian terkini atau terdahulu berkaitan dengannya.

Sumber eksplan adalah dari anak cambah yang dikultur di atas media MS tanpa hormon yang berumur seminggu. Eksplan-eksplan yang telah digunakan adalah kotiledon, hipokotil, akar, daun dan batang. Tisu daripada eksplan anak cambah ini didapati muda dan tiada pembezaaan sel yang berlaku seperti tisu matang. Tisu muda ini juga selalunya mempunyai keupayaan yang tinggi untuk regenerasi membentuk tumbuhan yang lengkap (Cheng, 1975; Konar dan Oberoi, 1965; Hu dan Sussex, 1971).

Sebanyak 21 kombinasi hormon BAP dan NAA telah digunakan untuk mendapatkan satu julat kombinasi hormon yang sesuai (Jadual 5.1). Media MS tanpa hormon telah digunakan sebagai media kawalan dan perbandingan dengan perlakuan hormon yang lain untuk semua jenis eksplan. Didapati eksplan daun dan batang tidak menunjukkan sebarang respons di atas media MS dengan kepekatan BAP (1.0 – 5.0 mg/l) dan NAA (1.0 – 5.0 mg/l).

Berdasarkan keputusan dan pemerhatian dari jadual 5.1, kesemua eksplan iaitu daun dan batang pada kepekatan BAP (1.0 – 5.0mg/l) dan NAA (1.0 – 5.0mg/l) hanya boleh menghasilkan kalus dan tidak berjaya menghasilkan pucuk berganda. Pada kombinasi 1.0mg/l BAP yang telah ditambah dengan 1.0mg/l NAA sehingga kombinasi 2.0mg/l BAP yang ditambah dengan 2.0mg/l NAA sahaja pembentukan akar yang abnormal serta kalus berlaku. Semua kalus yang terbentuk tidak berupaya untuk membentuk pucuk atau morfogenesis dan didapati mati selepas 2 kali disubkultur.

Eksperimen untuk mendapatkan pucuk berganda telah diteruskan lagi dengan menggunakan kombinasi hormon BAP (0.01 – 0.5mg/l) dan NAA (0.03 – 0.5mg/l) yang lebih rendah berbanding dengan jadual 5.1. Di dalam kajian ini eksplan daun, batang dan hipokotil telah digunakan. Dari jadual 5.2, eksplan hipokotil didapati berpotensi untuk menghasilkan pucuk berganda manakala eksplan daun dan batang masih lagi membentuk kalus bewarna putih kekuningan beserta pembentukan akar yang abnormal. Akar didapati terbentuk dengan cepat pada eksplan daun pada minggu pertama berbanding dengan batang dan hipokotil. Peratus penghasilan kalus didapati semakin menurun manakala peratus

pembentukan akar semakin meningkat terutama pada eksplan daun dan batang. Kalus yang terbentuk masih lagi tidak menunjukkan sebarang respons untuk morfogenesis dan didapati mati selepas 8 minggu.

Selain menggunakan kombinasi hormon BAP dan NAA untuk mendapatkan regenerasi lengkap tumbuhan, kombinasi pelbagai auksin dan sitokin yang lain berdasarkan kajian-kajian terdahulu terhadap famili Compositae turut digunakan seperti kinetin, TDZ, IAA, IBA dan 2,4-D. Eksplan yang telah digunakan pada kali ini adalah kotiledon, hipokotil dan batang. Eksplan hipokotil didapati telah memberikan respons yang baik terhadap pembentukan pucuk berganda terutama pada kombinasi hormon 0.50mg/l Kinetin yang telah ditambah dengan 0.05mg/l IAA (Plat 5.1) serta 0.125mg/l TDZ yang ditambah 0.125mg/l IAA (Plat 5.2). Purata bilangan pucuk yang didapati adalah 3.4 ± 0.32 dan 3.0 ± 0.25 (Jadual 5.3). Julat bilangan pucuk adalah di antara 1 hingga 5.

Penghasilan kalus selepas minggu keempat masih lagi berlaku terutama pada eksplan kotiledon dan batang pada media MS dengan 13 kombinasi hormon (Jadual 5.3). Pembentukan akar pada minggu pertama selepas dikultur masih lagi di dalam keadaan abnormal. Semua kalus yang terhasil tidak berupaya untuk proses morfogenesis. Pucuk-pucuk yang terhasil didapati berakar pada media MS tanpa hormon selepas 3 hari dipindahkan diikuti dengan pemanjangan dan tumbesaran pucuk.

Berdasarkan kepada jadual 5.1 – 5.3 didapati hanya eksplan hipokotil yang berupaya untuk penghasilan pucuk berganda di dalam media MS dengan

kombinasi 0.50mg/l Kinetin dan 0.05mg/l IAA (Plat 5.1) serta 0.125mg/l TDZ dengan 0.125mg/l IAA (Plat 5.2) selepas 3 minggu dikultur. Eksplan-eksplan lain seperti daun, batang dan kotiledon didapati hanya membentuk kalus dan akar sahaja. Semakin rendah kepekatan auksin dan sitokinin yang telah digunakan didapati pembentukan kalus semakin berkurangan manakala pembentukan akar semakin meninggi.

Bagi penentuan kepekatan sitokinin yang terbaik untuk inisiasi pucuk pula, hanya Zeatin dan BAP dengan kepekatan 0.001 – 3.0 mg/l telah digunakan. Eksplan hipokotil sahaja yang digunakan kerana berdasarkan kepada keputusan dan pemerhatian sebelum ini eksplan-eksplan lain didapati tidak berpotensi untuk pembentukan pucuk berganda. Berdasarkan jadual 5.4, kesemua 16 perlakuan iaitu Zeatin dengan kepekatan di antara 0.50 – 3.0mg/l serta BAP dengan kepekatan di antara 0.001 – 3.0mg/l, didapati berjaya menghasilkan pucuk. Kepekatan Zeatin pada 1.0 mg/l (Plat 5.3) adalah yang terbaik untuk penghasilan pucuk berganda terbanyak iaitu 4.3 ± 1.46 dengan julat bilangan pucuk di antara 2 hingga 14. Purata bilangan pucuk didapati semakin berkurangan dengan meningkatnya kepekatan hormon Zeatin melebihi dari 1.0 mg/l yang telah digunakan. Untuk hormon BAP pula hanya pada kepekatan 1.0 mg/l sahaja, purata bilangan pucuk yang tertinggi diperolehi iaitu 4.0 ± 2.31 dengan julat bilangan pucuk di antara 1 hingga 5 (Plat 5.4).

Terdapat banyak kajian dan laporan tentang kejayaan kultur tisu ke atas tanaman hiasan dari famili Compositae yang mempunyai nilai komersial dan hortikultur yang tinggi. Reynoird *et al.* (1993) telah berjaya memperolehi

regenerasi lengkap ke atas *Gerbera hybrida* daripada eksplan daun di atas media MS yang terubahsuai dengan kepekatan $10.0\mu\text{M}$ BAP dan $2.5\mu\text{M}$ NAA. Murashige *et al.* (1974) pula berjaya memperolehi pucuk berganda melalui eksplan hujung pucuk ke atas *Gerbera jamesonii*. Pugliesi *et al.* (1993) pula memperolehi regenerasi lengkap dengan menggunakan eksplan kotiledon ke atas *Helianthus tuberosus* dan *H. annuus* x *H. tuberosus* pada media MS yang telah ditambah dengan 4.0 mg/l BAP dan 0.5 mg/l IAA. Paterson dan Everett (1985) pula memperolehi regenerasi lengkap dengan menggunakan eksplan hipokotil ke atas *Helianthus annuus*. Bagi *Chrysanthemum spp.* pula keupayaan regenerasi yang tinggi telah banyak dilaporkan melalui eksplan daun (Kaul *et al.*, 1990; Bhattacharya *et al.*, 1990). Grewal dan Sharma (1978) telah memperolehi pucuk berganda ke atas *Chrysanthemum cinerariaefolium* melalui eksplan pucuk manakala Ben-Jaacov dan Langhans (1972) pula telah memperolehi pucuk berganda melalui eksplan petiol, pedisel dan pucuk ke atas *Chrysanthemum morifolium*. Bagi *Z. elegans* pula eksplan hipokotil telah didapati berjaya menginduksikan pucuk berganda di atas media MS dengan kepekatan hormon 1.0 mg/l Zeatin. Keputusan ini dapat menunjukkan setiap spesies tanaman hiasan walaupun daripada famili yang sama iaitu Compositae didapati memerlukan keperluan yang berbeza untuk regenerasi lengkap.

Media yang terbaik untuk pembentukan akar pula telah ditentukan dengan pengkulturan segmen akar primer yang berusia 5 hari di dalam media MS dengan pelbagai kombinasi hormon BAP dan NAA. Sebanyak 18 perlakuan telah diuji dengan kepekatan BAP di antara 0.5 hingga 3.0 mg/l serta kepekatan NAA di antara 0.01 hingga 3.0 mg/l . Berdasarkan jadual 4.1 dan plat 4.1 hingga 4.3

didapati media MS tanpa hormon adalah media yang terbaik dan tercepat untuk pembentukan akar atau untuk menginduksikan akar dari eksplan akar tanpa pembentukan kalus. Tidak terdapat sebarang pembentukan pucuk yang berlaku. Rao *et al.* (1976) juga mendapat keputusan yang sama ke atas *Anthirrhinum majus* dan *A. microphyllum* di mana pucuk-pucuk yang diperolehi membentuk akar pada media MS tanpa hormon. Pugliesi *et al.* (1993) juga telah melaporkan keadaan yang sama di mana pembentukan akar *Helianthus tuberosus* dan *H. annuus* x *H. tuberosus* berjaya diperolehi pada media MS separuh kepekatan tanpa hormon.

Didapati peningkatan kepekatan hormon NAA dari 0.01 kepada 0.05 mg/l boleh menyebabkan pemanjangan akar terencat serta pembentukan kalus berlaku. Ini kemungkinan menunjukkan setiap eksplan *Z. elegans* ada mengandungi hormon auksin endogenous yang mencukupi untuk inisiasi akar. Ini jelas terbukti dengan penggunaan media MS tanpa hormon di mana pembentukan akar adalah normal dan terbentuk paling cepat tanpa pembentukan kalus.

Oleh kerana terdapat kajian yang menunjukkan perpindahan tisu dari keadaan *in vivo* kepada keadaan *in vitro* akan menyebabkan perubahan kandungan genetik pada tumbuhan yang diregenerasikan (Larkin dan Scowcroft, 1987; Swartz, 1991), maka kajian sitologi terhadap aktiviti sel akar *in vitro* telah dijalankan untuk memerhati sebarang perubahan yang terdapat pada peringkat sel. Kajian aktiviti sel yang telah dilakukan meliputi penentuan indeks mitosis (MI), bilangan kromosom, penentuan kandungan DNA Nukleus, purata luas sel dan nukleus serta penentuan masa penggandaan sel (Cdt).

Merujuk kepada jadual 4.2 didapati nilai purata indeks mitosis sel (MI) akar primer *in vitro* yang berumur 7 hari adalah $15.60 \pm 0.20\%$. Nilai ini didapati lebih tinggi berbanding dengan nilai purata indeks mitosis sel akar primer yang ditanam secara *in vivo* ($13.47 \pm 0.43\%$). Nilai purata indeks mitosis *in vitro* yang tinggi ini menunjukkan tisu-tisu *Z. elegans* lebih aktif membahagi di dalam keadaan *in vitro* berbanding dengan dalam keadaan *in vivo* serta mempunyai keupayaan regenerasi yang tinggi. Keadaan ini jelas terbukti seperti yang telah dilaporkan oleh Abdullah (1998) di mana kajian beliau terhadap *Petunia hybrida* menunjukkan nilai MI *in vitro* ($39.85 \pm 0.39\%$) adalah lebih tinggi dari nilai MI *in vivo* ($11.63 \pm 0.26\%$). Beliau memperolehi kadar regenerasi yang tinggi dalam kajian kultur tisu terhadap *P. hybrida*. Abu Shah dan Taha (1994) pula dalam kajian mereka ke atas *Psophocarpus tetragonolobus* mendapati nilai MI yang rendah dalam keadaan *in vitro* ($3.88 \pm 1.26\%$) berbanding dengan *in vivo* ($4.37 \pm 0.25\%$). Keadaan ini boleh menyebabkan regenerasi daripada eksplan tumbuhan tersebut menjadi amat sukar.

Kajian ini juga berdasarkan jadual 4.3 dan rajah 4.2 menunjukkan sel meristem akar dalam keadaan *in vitro*, kebanyakannya berada pada fasa G2 iaitu 41.62%, poliploid sebanyak 38.38% dan fasa S sebanyak 20%. Manakala fasa G1 tetap 0%. Nilai ini didapati hampir sama berbanding dengan sel akar *in vivo*. Daripada keputusan ini menunjukkan perpindahan tisu dari keadaan *in vivo* kepada *in vitro* boleh menyebabkan kebanyakan sel mula memasuki fasa S berbanding dengan fasa G2. Ini jelas kelihatan dengan peningkatan peratus fasa S pada keadaan *in vitro* (20%) berbanding dengan *in vivo* (14.37%) serta pengurangan peratus pada fasa G2 dari keadaan *in vivo* (55.62%) kepada keadaan

in vitro (41.62%). Walau bagaimanapun keadaan poliploid didapati wujud pada kedua-dua keadaan iaitu *in vivo* dan *in vitro*.

Das *et al.* (1958) mendapati penambahan auksin ke dalam media kultur boleh merangsang dan mengubah aktiviti sel di dalam keadaan *in vitro* berbanding dengan *in vivo*. Yeoman dan Mitchell (1970) mendapati keadaan yang serupa telah berlaku ke atas *Helianthus tuberosus* di mana kebanyakan sel dalam keadaan *in vivo* berada dalam keadaan rehat iaitu pada fasa G1 tetapi dengan penambahan hormon auksin didapati sel-sel kebanyakannya berada pada fasa S, G2 dan mitosis. Minocha (1979) juga menyatakan penambahan hormon pengawalatur tumbesaran akan menambahkan bilangan nukleus yang memasuki fasa S. Keadaan ini didapati berlaku pada sel akar primer *Z. elegans* apabila dipindah dari keadaan *in vivo* kepada *in vitro*.

Peratus populasi sel yang kurang berada pada fasa rehat atau G1 menunjukkan populasi sel tersebut adalah aktif membahagi. Keadaan ini akan mempengaruhi nilai Cdt atau masa penggandaan sel di mana didapati kebanyakan sel berada pada fasa mitosis. Ini akan menyebabkan nilai Cdt menjadi rendah atau masa penggandaan sel menjadi semakin cepat kerana sel-sel lebih aktif membahagi. Di dalam kajian ini berdasarkan jadual 4.2 dan rajah 4.1 didapati masa penggandaan sel yang diperlukan oleh sel meristem akar *in vitro* *Z. elegans* untuk menggandakan populasinya adalah 96 jam. Nilai ini didapati lebih rendah berbanding dengan sel meristem akar *in vivo* iaitu 133 jam. Oleh kerana itu, didapati tiada langsung sel-sel yang berada pada fasa G1 iaitu fasa rehat sel serta

terdapat peningkatan peratus sel-sel yang memasuki fasa S iaitu fasa aktif dan masa penggandaan sel yang lebih cepat berbanding dengan keadaan *in vivo*.

Purata bilangan kromosom *Z. elegans* *in vitro* pula adalah $2n=23$ dengan julat di antara 18 hingga 28 (Jadual 4.2). Nilai ini didapati sama dengan bilangan kromosom untuk *in vivo* iaitu $2n=23$. Keadaan ini menunjukkan kestabilan bilangan kromosom apabila dipindah dari keadaan *in vivo* kepada *in vitro*. Abdullah (1998) juga telah melaporkan keadaan yang sama pada *Petunia hybrida* di mana bilangan kromosom *in vitro* dan *in vivo* adalah sama iaitu $2n=14$ walaupun dibiarkan selama 8 minggu di dalam kultur.

Purata luas sel akar *Z. elegans* yang telah dikultur secara *in vitro* (Jadual 4.4 dan Rajah 4.3) didapati menunjukkan pengurangan dari segi saiz berbanding dengan sel-sel dalam keadaan *in vivo* ($113.55 \pm 4.44\mu\text{m}^2$) iaitu $92.40 \pm 5.70\mu\text{m}^2$ dan purata luas nukleus juga menunjukkan pengurangan dari segi saiz iaitu $36.86 \pm 1.44\mu\text{m}^2$ (Jadual 4.4 dan Rajah 4.4) berbanding dengan *in vivo* ($40.58 \pm 0.95\mu\text{m}^2$). Manakala nisbah luas nukleus kepada sel ialah 0.48 (Jadual 4.4) iaitu lebih besar berbanding dengan *in vivo* iaitu 0.39. Keputusan yang sama juga didapati bagi *P. hybrida* untuk purata luas sel akar yang telah ditanam secara *in vitro* iaitu $158.38 \pm 6.57\mu\text{m}^2$ berbanding dengan *in vivo* $113.72 \pm 3.82\mu\text{m}^2$ dan untuk purata luas nukleus *in vitro* pula adalah $41.58 \pm 0.99\mu\text{m}^2$ berbanding dengan *in vivo* $35.55 \pm 1.83\mu\text{m}^2$ (Abdullah, 1998).

Dalam kajian ini, sepatutnya purata luas sel dan nukleus menunjukkan pertambahan dari segi saiz apabila dipindahkan dari keadaan *in vivo* kepada *in*

vitro. Mengikut Jordan *et al.* (1987) saiz sel dan nukleus telah dikawal oleh kuantiti DNA. Ini bermakna sel yang mempunyai kuantiti DNA yang lebih akan menunjukkan keluasan sel dan nukleus yang lebih besar. Dalam kajian ini saiz sel dan nukleus menunjukkan pengurangan dari segi saiz kerana tiada sel yang berada pada fasa G1 dan kebanyakannya berada pada fasa G2. Kekurangan saiz ini juga disebabkan sel-sel sedang membahagi untuk pembentukan organ.

Kajian kultur tisu yang melibatkan tumbuhan hiasan dari famili Rosaceae pula iaitu spesies hibrid *Rosa hybrida* L. var ‘Christian Dior’ memberikan keputusan yang jauh berbeza dengan tumbuhan hiasan dari famili Compositae iaitu *Zinnia elegans* Jacq. Walaupun pada awalnya kajian yang sama iaitu meliputi kajian kultur tisu dan aktiviti sel hendak dijalankan terhadap *R. hybrida*, bertujuan untuk membandingkan kedua-dua spesies ini tetapi oleh kerana ketiadaan dan kekurangan biji benih bagi *R. hybrida*, kajian aktiviti sel tidak dapat dijalankan. Hanya kajian kultur tisu sahaja yang dapat dijalankan ke atas spesies ini. Objektif utama kajian adalah untuk mendapatkan regenerasi lengkap dari sumber eksplan daun, petiol, batang dan tunas sisi. Kajian dimulakan dengan mengkaji kesan kombinasi hormon auksin dan sitokinin pada kepekatan yang berbeza. Ini bertujuan untuk mendapatkan perlakuan yang sesuai untuk pembentukan kalus, pucuk dan seterusnya akar.

Kombinasi hormon BAP dan NAA sahaja yang digunakan dalam kajian ke atas *R. hybrida*, ini adalah kerana berdasarkan kajian-kajian terdahulu didapati pembentukan kalus, pucuk dan akar kebanyakannya diinduksikan oleh kombinasi hormon BAP dan NAA. Ishioka dan Tanimoto (1990) telah memperolehi kalus

daripada eksplan batang *Rosa damascena* dengan menggunakan 10.0 μ M NAA. Lloyd *et al.* (1988) juga memperolehi kalus daripada eksplan batang *Rosa persica* x *Rosa xanthina* dengan kepekatan 0.5 – 1.6 μ M NAA dan 4.4 – 8.9 μ M BAP. Rout *et al.* (1992) pula memperolehi kalus daripada eksplan daun dengan kombinasi hormon 2.2 μ M BAP dan 0.54 μ M NAA serta eksplan batang dengan kombinasi hormon 8.9 μ M BAP dan 22.9 μ M NAA pada *Rosa hybrida* L. ‘Landora’.

Dalam kajian ini daun, petiol dan batang yang muda telah digunakan sebagai sumber eksplan kerana ia lebih berpotensi untuk menghasilkan regenerasi lengkap. Jadual 6.1, 6.2 dan 6.3 menunjukkan kesan pelbagai kombinasi hormon BAP dan NAA ke atas penghasilan kalus dan pucuk pada eksplan yang dikultur. Secara keseluruhannya kesemua kombinasi hormon BAP (1.0 – 5.0 mg/l) dan NAA (1.0 – 5.0 mg/l) telah berjaya menginduksikan kalus pada eksplan daun, batang dan petiol pada media asas MS (1962) tetapi tidak berjaya menghasilkan pucuk berganda dan pembentukan akar. Pada media kawalan iaitu media MS tanpa hormon kesemua eksplan mati dan tiada respons. Terdapat hanya beberapa kajian mengenai *Rosa spp.* yang melaporkan berjaya mendapatkan regenerasi lengkap tetapi ianya terhad kepada beberapa kultivar sahaja. Kesukaran untuk mendapatkan regenerasi lengkap berkemungkinan disebabkan oleh faktor-faktor seperti ketidakserasan formulasi media atau disebabkan oleh faktor genetik. Regenerasi lengkap *Rosa spp.* telah terbukti amat sukar untuk diperolehi (Hsia dan Korban, 1996).

Di dalam pembentukan kalus, eksplan daun didapati paling cepat memberi respons. Manakala eksplan petiol adalah yang paling lambat sekali. Ini terbukti dengan keputusan penghasilan purata berat kalus. Eksplan daun mempunyai purata berat segar kalus yang tertinggi berbanding dengan eksplan-eksplan lain (Rajah 6.4). Berdasarkan rajah 6.1 berat segar kalus yang tertinggi bagi eksplan daun didapati pada kombinasi 3.0 mg/l BAP dan 2.0 mg/l NAA iaitu 1.13g (Jadual 6.1 dan Plat 6.1-6.4). Purata berat kalus didapati semakin berkurangan apabila melebihi kombinasi ini. Bagi eksplan batang pula berdasarkan jadual 6.1 dan rajah 6.2 purata berat kalus yang tertinggi diperolehi pada kombinasi hormon 2.0 mg/l BAP dan 4.0 mg/l NAA iaitu 0.77g (Plat 6.5-6.8). Pembentukan kalus didapati lebih lambat berbanding dengan eksplan daun iaitu pada minggu kedua. Eksplan petiol pula menghasilkan purata berat segar kalus tertinggi pada kombinasi hormon 1.0 mg/l BAP dan 3.0 mg/l NAA iaitu 0.52g (Jadual 6.1, Rajah 6.3 dan Plat 6.9-6.10). Eksplan petiol didapati adalah eksplan yang paling tidak responsif untuk penghasilan purata berat segar kalus dan didapati mati selepas minggu keempat (Rajah 6.4).

Kebanyakan kalus didapati mula kelihatan pada minggu pertama dan terbentuk pada permukaan eksplan yang terpotong atau pada permukaan atas eksplan. Pemerhatian yang sama juga didapati pada kebanyakan *Rosa spp.* di mana kalus mula terbentuk pada permukaan eksplan yang terpotong dan terdapat juga kalus yang terbentuk pada permukaan atas eksplan di mana akhirnya menutupi keseluruhan eksplan (Ishioka dan Tanimoto, 1990; Rout *et al.*, 1991; Borejsza Wysocki dan Hrazdin, 1994). Kesemua eksplan tidak berpotensi untuk menghasilkan regenerasi lengkap atau membentuk kalus embriogenik. Noriega

dan Sondahl (1991) telah melaporkan keputusan yang sama pada *Rosa hybrida* L. ‘Royalty’ di mana penggunaan eksplan daun tidak berupaya menghasilkan kalus embriogenik. Loyd *et al.* (1988) juga memperolehi keputusan yang serupa ke atas *Rosa hybrida* L. ‘Clarissa’, *Rosa hybrida* L. ‘Dame of Sark’, *R. rugosa* Thunb. ‘Scarbosa’, *R. wichuriana* Crep. dan *R. laevigata* Michx menggunakan eksplan batang. Walaupun begitu terdapat juga kajian yang melaporkan kejayaan memperolehi somatik embriogenesis terhadap *Rosa hybrida* L. ‘Vickey Brown’ dan *Rosa hybrida* L. ‘Domingo’ tetapi untuk kultivar ‘Tineke’, ‘Selflour’, ‘Azteca’, ‘Carambole’ dan ‘Tanja’ hanya kalus sahaja diperolehi (De Wit *et al.*, 1990). Ini menunjukkan tidak semua kultivar *Rosa hybrida* berupaya untuk regenerasi lengkap walaupun daripada genus yang sama. Setiap kultivar mempunyai keupayaan regenerasi yang berbeza.

Kalus yang terbentuk dari kultivar *Rosa hybrida* mempunyai pelbagai warna dan tekstur. Secara amnya didapati jika kadar auksin melebihi sitokin ini kalus yang terhasil adalah lembut dan rapuh serta berwarna kekuningan manakala jika kadar sitokin ini melebihi auksin, kalus yang terhasil adalah keras dan berwarna kehijauan. Sriskandarajah *et al.* (1994) dan Van der Salm *et al.* (1996) juga telah memperolehi keputusan yang sama di mana untuk *R. persica* x *R. xanthina* kalus yang diinduksikan hanya dengan menggunakan auksin sahaja didapati mempunyai tekstur seperti jeli.

Untuk kombinasi hormon BAP dan NAA yang terbaik bagi pembentukan pucuk hanya eksplan tunas sisi sahaja yang digunakan memandangkan eksplan-eksplan lain tidak berjaya untuk penghasilan pucuk.

Kesemua 13 kombinasi hormon BAP (1.0 – 3.0 mg/l) dan NAA (1.0 – 3.0 mg/l) yang telah digunakan berjaya menghasilkan pucuk pada media asas MS (1962). Julat bilangan pucuk yang diperolehi adalah di antara 1 hingga 7. Media yang terbaik untuk induksi pucuk didapati pada media MS dengan kepekatan 3.0mg/l BAP dengan purata bilangan pucuk sebanyak 3.4 ± 0.70 . Keputusan yang didapati ini menepati kajian yang telah dilakukan oleh Valles dan Boxus (1987) iaitu eksplan batang hanya akan mampu menghasilkan regenerasi dengan kehadiran BAP yang tinggi iaitu 4.0 – 22.0 μM serta dengan ketiadaan auksin. Daripada jadual 6.2 didapati pucuk mula terbentuk 2-3 minggu selepas dikultur. Penghasilan purata bilangan pucuk didapati semakin meningkat apabila nisbah BAP: NAA melebihi dari nilai 1.0 atau kepekatan BAP melebihi kepekatan NAA. Pembentukan kalus kekuningan dan keras didapati berlaku selepas pembentukan pucuk pada kombinasi 2.0mg/l BAP dengan 3.0mg/l NAA dan 3.0mg/l BAP dengan 3.0mg/l NAA. Kejayaan pertama dalam pembentukan primordia pucuk telah dilaporkan oleh Hill (1967) ke atas *Rosa hybrida* L. ‘The Doctor’. Pucuk yang diperolehi telah diinduksikan daripada kalus eksplan batang dengan menggunakan $4.7\mu\text{M}$ Kinetin dan 1.0g/l peptone. Lloyd *et al.* (1988) juga memperolehi pucuk daripada eksplan batang *Rosa persica* x *Rosa xanthina* dengan kombinasi hormon $13.3\mu\text{M}$ BAP dan $0.5 - 1.6\mu\text{M}$ NAA. Beliau juga memperolehi pucuk ‘adventitious’ daripada eksplan daun tanpa fasa kalus dengan menggunakan $2.2\mu\text{M}$ BAP. Walau bagaimanapun peratus regenerasi pucuk menurun selepas 3 kali disubkultur.

Di dalam kajian untuk pembentukan akar pula kesemua kombinasi hormon di antara 1.0 – 5.0 mg/l NAA tidak menunjukkan sebarang respons untuk

pembentukan akar walaupun dibiarkan di dalam kultur selama 12 minggu dengan 3 kali subkultur. Kesemua eksplan pucuk berganda didapati mati selepas 4 minggu di dalam kultur. Walau bagaimanapun terdapat juga kajian yang melaporkan kejayaan memperolehi akar seperti Rout *et al.* (1991) telah berjaya memperolehi akar daripada pucuk ‘adventitious’ *Rosa hybrida* L. ‘Landora’ dengan kepekatan 0.1mg/l NAA. Manakala Hsia dan Korban (1996) telah berjaya memperolehi akar daripada kalus ros ‘Baby Katie’ dengan kepekatan hormon 11.0 – 27.0 μ M NAA. Pada ros ‘Red Sunblaze’ pula ia telah berjaya memperolehi akar daripada kalus dengan kepekatan hormon 11.0 μ M NAA. Pada ros ‘Carefree Beauty’ ia telah berjaya memperolehi akar dengan kepekatan hormon 11.0 – 27.0 μ M NAA. Kesukaran untuk mendapatkan akar ini mungkin disebabkan oleh faktor-faktor seperti tahap komposisi garam mineral, formulasi media, tahap kepekatan sukrosa yang berfungsi untuk mengawalatur keupayaan osmosis dan sebagai sumber tenaga kepada tisu, pH media, serta jenis, tahap kepekatan dan kombinasi auksin dan sitokinin di mana keperluan bagi setiap spesies tumbuhan adalah berbeza (Gamborg *et al.*, 1976; Conger, 1981; Hughes, 1981; George dan Sherrington, 1984). Mengikut Skirvin (1981) pula faktor seperti sumber eksplan juga boleh mempengaruhi pembentukan akar di mana eksplan yang diambil dari bahagian yang lain akan mempunyai umur fisiologi dan jenis tisu yang berlainan. Sebagai contoh kalus yang didapati daripada eksplan akar *Nigella sativa* hanya menghasilkan akar sahaja manakala kalus yang diperolehi daripada batang dan daun hanya menghasilkan pucuk sahaja (Banergee dan Gupta, 1976). Walaupun daripada genus dan famili yang sama tisu-tisu daripada pelbagai eksplan dan berlainan kultivar akan memberikan respons yang berbeza terhadap proses morfogenesis (Hussey 1976).

Di dalam kajian ini juga didapati terdapat perbezaan yang ketara di antara sistem kultur tisu tanaman hiasan jenis herba seperti *Zinnia elegans* Jacq. dan berkayu seperti *Rosa hybrida* L. var ‘Christian Dior’. Perbezaan ini termasuklah dari segi penggunaan sumber eksplan yang berlainan, teknik pensterilan, jenis eksplan yang paling responsif untuk pembentukan kalus, pucuk dan akar serta penggunaan pelbagai jenis hormon auksin dan sitokinin dengan pelbagai kombinasi untuk proses morfogenesis. Penggunaan media optima untuk penghasilan pucuk dan akar juga turut berbeza bagi kedua-dua spesies tanaman hiasan ini.

Bagi kajian kultur tisu ke atas *Z. elegans* sumber eksplan adalah daripada biji benih yang telah dicambahkan secara *in vitro*. Sebelum biji benih dicambahkan dalam keadaan *in vitro*, ianya terlebih dahulu dibasuh dengan menggunakan klorox 50% selama 5 minit, 30% selama 7 minit dan 15% selama 11 minit. Akhir sekali biji benih dibilas dengan air suling selama 3 minit sebanyak 3 kali sebelum dikultur di dalam media MS tanpa hormon pada suhu $25\pm1^{\circ}\text{C}$ dengan 8 jam gelap dan 16 jam cahaya. Jenis-jenis eksplan yang telah digunakan adalah daun, batang, akar, kotiledon dan hipokotil. Manakala bagi *Rosa hybrida* L. var ‘Christian Dior’ sumber eksplan telah diambil daripada tumbuhan ‘intact’. Oleh itu teknik pensterilannya adalah lebih rumit kerana kadar kontaminasi yang tinggi. Eksplan yang telah digunakan adalah daun, batang, petiol dan tunas sisi. Kesemua eksplan ini diambil dari bahagian yang muda. Teknik pensterilan yang telah digunakan ke atas semua eksplan ini adalah ianya terlebih dahulu dibilas dengan air suling steril sebanyak 3 kali selama 5 minit untuk membuang segala kekotoran yang ada sebelum dicuci dengan klorox 70% selama 3 minit, 50%

selama 7 minit, 30% selama 12 minit dan 15% selama 15 minit. Akhirnya sebelum dibilas dengan air suling sebanyak 3 kali selama 3 minit eksplan ini dicelup ke dalam larutan alkohol 70% selama 1 minit. Kemudian barulah eksplan ini dikultur ke atas media. Keseragaman dari segi umur fisiologi eksplan tidak dapat ditentukan bagi *Rosa hybrida* L. var 'Christian Dior' kerana sumber eksplan yang terhad dari tumbuhan 'intact' serta teknik pensterilan yang rumit dengan kadar kontaminasi yang tinggi.

Dari segi jenis eksplan yang paling responsif pula didapati kesemua eksplan *Z. elegans* seperti daun, batang, akar, kotiledon dan hipokotil adalah sangat responsif untuk morfogenesis. Kesemua eksplan ini mudah untuk membentuk kalus dan akar walaupun pada media MS tanpa hormon. Berbanding dengan *Rosa hybrida* L. var 'Christian Dior' pula eksplan daun didapati lebih responsif untuk membentuk kalus berbanding dengan batang dan petiol. Eksplan daun didapati telah menghasilkan purata berat kalus yang tertinggi iaitu 1.13 g (Rajah 6.4). Hanya kalus sahaja yang terbentuk bagi kesemua eksplan *Rosa hybrida* L. var 'Christian Dior' tanpa pembentukan akar. Bagi *Z. elegans* eksplan yang paling responsif untuk penghasilan pucuk adalah eksplan hipokotil manakala untuk *Rosa hybrida* L. var 'Christian Dior' pula eksplan tunas sisi didapati yang terbaik untuk penghasilan pucuk berganda. Pembentukan akar bagi pucuk-pucuk yang terhasil dari eksplan hipokotil *Z. elegans* berjaya diinduksikan pada media MS tanpa hormon dalam masa 3 hari. Penambahan hormon NAA (0.01-3.0 mg/l) didapati akan menghasilkan kalus walaupun pada kepekatan yang rendah iaitu 0.01 mg/l NAA. Ini menunjukkan eksplan *Z. elegans* mempunyai hormon endogenous yang mencukupi untuk menginduksikan akar tanpa penambahan

hormon eksogenous. Berbanding *Rosa hybrida* L. var 'Christian Dior' kesemua perlakuan hormon NAA dengan kepekatan 1.0 – 5.0 mg/l tidak berupaya menghasilkan akar walaupun dibiar selama 12 minggu dalam kultur dengan 3 kali subkultur.

Media optima untuk penghasilan pucuk berganda *Z. elegans* daripada eksplan hipokotil telah berjaya diperolehi pada media MS dengan kepekatan 1.0 mg/l Zeatin. Purata bilangan pucuk yang telah diperolehi adalah 4.3 ± 1.46 dengan julat bilangan pucuk 2 hingga 14. Hormon Zeatin didapati lebih baik untuk menginduksi pucuk berganda berbanding dengan hormon sitokinin yang lain seperti BAP, Kinetin dan TDZ. Manakala hormon auksin seperti NAA, IAA, IBA dan 2,4-D tidak diperlukan sama sekali. Media optima untuk *Rosa hybrida* L. var 'Christian Dior' pula telah berjaya diperolehi pada media MS dengan kepekatan 3.0 mg/l BAP melalui eksplan tunas sisi. Purata bilangan pucuk yang telah diperolehi adalah 3.4 ± 0.70 dengan julat bilangan pucuk di antara 1 hingga 7. Bagi *Rosa hybrida* L. var 'Christian Dior' didapati hormon BAP adalah yang terbaik untuk penghasilan pucuk berganda. Kepekatananya yang diperlukan didapati lebih tinggi iaitu 3.0 mg/l berbanding dengan *Z. elegans* iaitu 1.0 mg/l. Keputusan ini jelas menunjukkan bahawa tanaman hiasan jenis herba lebih mudah untuk regenerasi lengkap membentuk pucuk dan akar berbanding dengan tanaman hiasan jenis berkayu yang sukar dan lambat untuk menghasilkan akar dan pucuk berganda.

KESIMPULAN

Purata panjang akar primer anak cambah *Zinnia elegans* Jacq. yang telah dicambahkan secara aseptik pada piring petri yang mengandungi kapas basah dengan diberi 16 jam cahaya dan 8 jam gelap pada suhu $25 \pm 1^\circ\text{C}$ adalah $40.82 \pm 15.39\text{mm}$ atau kadar pemanjangan akar primernya adalah 9.71 mm/hari . Persamaan regresi yang didapati adalah $Y = 9.71x - 6.59$ dengan koefisien korelasi $r = 0.99$. Julat purata pemanjangan akar yang diperolehi adalah di antara $25.43 - 56.21\text{mm}$.

Nilai purata indeks mitosis (MI) bagi sel-sel akar primer *Z. elegans* yang telah ditanam secara *in vivo* adalah $13.47 \pm 0.46\%$ dengan bilangan kromosom sebanyak $2n=23$. Sel-sel meristem akar dalam sistem *in vivo* ini mempunyai purata luas sel sebanyak $113.55 \pm 4.44\text{ }\mu\text{m}^2$ dan purata luas nukleus sebanyak $40.58 \pm 0.95\text{ }\mu\text{m}^2$. Masa penggandaan sel (Cdt) yang diperlukan adalah 133 jam dengan taburan kandungan DNA menunjukkan kebanyakan sel-sel berada pada fasa G2 (55.62%).

Apabila sel-sel meristem akar ini dipindahkan dari keadaan *in vivo* kepada *in vitro*, nilai purata indeks mitosis (MI) telah bertambah kepada $15.60 \pm 0.20\%$ tetapi telah mengekalkan bilangan kromosom yang sama iaitu sebanyak $2n=23$. Keadaan ini menyebabkan masa penggandaan sel menjadi semakin singkat bagi sel-sel akar *in vitro* iaitu selama 96 jam berbanding dengan 133 jam dalam sistem *in vivo*. Taburan kandungan DNA nukleus telah menunjukkan kebanyakan sel-sel berada pada fasa G2 (41.62%). Purata luas sel didapati semakin berkurangan di

dalam sistem *in vitro* iaitu $92.40 \pm 5.70 \mu\text{m}^2$ berbanding dengan sistem *in vivo* iaitu $113.55 \pm 4.44 \mu\text{m}^2$ dan purata luas nukleus sebanyak $36.86 \pm 1.44 \mu\text{m}^2$ di dalam sistem *in vitro* berbanding dengan $40.58 \pm 0.95 \mu\text{m}^2$ dalam keadaan *in vivo*.

Kajian kultur tisu ke atas *Zinnia elegans* Jacq. telah menunjukkan hanya eksplan hipokotil berpotensi untuk regenerasi membentuk plantlet lengkap atau pucuk berganda di dalam media MS yang telah dibekalkan dengan hormon BAP (1.0mg/l) dan Zeatin ($0.50 - 1.5 \text{mg/l}$). Eksplan-eksplan lain seperti kotiledon, batang, daun dan akar tidak menunjukkan sebarang respons untuk membentuk pucuk berganda. Media MS dengan kepekatan Zeatin di antara $0.5 - 1.5 \text{mg/l}$ (Jadual 5.4 dan Plat 5.3, 5.4) didapati berpotensi untuk penghasilan pucuk berganda. Media MS dengan kepekatan 1.0 mg/l Zeatin telah merupakan media yang terbaik untuk penghasilan pucuk berganda yang terbanyak iaitu 4.3 ± 1.46 dengan julat bilangan pucuk di antara 2 hingga 14 (Jadual 5.4 dan Plat 5.3). Media yang terbaik untuk pembentukan akar pula adalah media MS tanpa hormon (Plat 5.5a). Ini berkemungkinan hormon auksin endogenous yang didapati di dalam eksplan yang dikultur adalah mencukupi untuk menggalakkan pembentukan akar. Penambahan hormon auksin seperti NAA akan boleh menyebabkan pertumbuhan akar terencat serta menggalakkan pembentukan kalus.

Selain daripada hormon Zeatin, kombinasi hormon Kinetin (0.50mg/l) dan IAA (0.05mg/l) serta kombinasi hormon TDZ (0.125mg/l) dengan IAA (0.125mg/l) juga didapati berpotensi untuk penghasilan pucuk berganda (Jadual 5.3 dan Plat 5.1, 5.2). Plantlet lengkap *Zinnia elegans* Jacq. yang telah diperolehi

melalui sistem kultur tisu didapati stabil setelah dipindahkan dari keadaan *in vitro* kepada *in vivo*. Ini berdasarkan keputusan dan pemerhatian terhadap aktiviti-aktiviti sel atau kajian sitologi ke atas akar primer *in vivo* dan *in vitro* yang didapati hampir sama. Tiada perbezaan ketara dari segi sitologi yang diperolehi di antara keadaan *in vivo* dan *in vitro*.

Kajian kultur tisu ke atas *Rosa hybrida* L. var. 'Christian Dior' pula mendapati potensi regenerasi serta penghasilan akar adalah amat sukar untuk diperolehi. Hanya eksplan tunas sisi yang berjaya menghasilkan pucuk berganda. Eksplan-eksplan yang lain seperti daun, batang dan petiol hanya berupaya menghasilkan kalus sahaja. Kesemua perlakuan iaitu kombinasi hormon BAP dan NAA di antara 1.0 – 3.0mg/l didapati berjaya menghasilkan pucuk berganda. Walau bagaimanapun, media yang terbaik untuk penghasilan pucuk berganda yang terbanyak adalah pada media MS dengan 3.0 mg/l BAP. Tiada sebarang pembentukan akar yang diperolehi pada semua eksplan untuk semua perlakuan. Oleh sebab itu, tiada media untuk pembentukan akar yang diperolehi serta tiada kajian sitologi atau aktiviti sel akar yang dapat dijalankan.