

## **ABSTRACT**

Tissue culture studies were carried out on two species of ornamental plants, namely *Zinnia elegans* Jacq. and *Rosa hybrida* L. var. 'Christian Dior'. In *Zinnia elegans* Jacq., some cytological studies were also done but in *R. hybrida*, the same aspect of work could not be done due to the failure of promoting root growth in culture as well as the seeds were not available. Thus, no roots from *in vivo* and *in vitro* systems could be obtained. Changes in cellular behaviour usually occur when cells or tissues are transferred from *in vivo* to *in vitro* system. It has been shown that cells and tissues in some species of dicotyledons are capable of regeneration, possess some cellular characteristics opposite to that of cells or tissues that cannot give rise to plantlets or even from the *in vivo* plant. Therefore, the purpose of the cytological work in this project is to check the cellular behaviour in *in vivo* and *in vitro* systems by determining their mitotic indices, chromosome numbers, nuclear DNA contents, ploidy levels, cell and nuclear areas and cell doubling times. By assessing these parameters, it might be possible to distinguish the cellular behaviour of *in vitro* plants compared with *in vivo* plants. If any variation occurs in nuclear and cellular compositions of these *in vitro* tissues, this can lead to somaclonal variation.

However, if cellular composition in the culture system is stable then most probably the regenerative potential is greater. In other words, it may be possible to predict whether tissues or cells characterized by a particular pattern of cellular behaviour are capable of growing into a plantlet or will remain as unorganized structure, i.e callus.

From the first experiment, it was found that the primary root elongation of *Z. elegans* was optimum on the fifth day with a value of  $40.82 \pm 15.39$  mm. Thus, the root segment with an elongation in the range of 25.43 to 56.21 mm has been adopted as the standard length for the *in vivo* and *in vitro* cytological studies. *In vivo* cytological studies on *Z. elegans* revealed that the mitotic index (MI) measured was  $13.47 \pm 0.46\%$ , the chromosome number observed was  $2n = 23$ , the average cell and nuclear area values were  $113.55 \pm 4.44 \mu\text{m}^2$  and  $40.58 \pm 0.95 \mu\text{m}^2$  respectively. The cell doubling time (Cdt) obtained *in vivo* was 133 hours, whereas from the *in vitro* study, mitotic index (MI) measured was  $15.60 \pm 0.20\%$ , the chromosome number observed was  $2n = 23$ , average cell and nuclear area values were  $92.40 \pm 5.70 \mu\text{m}^2$  and  $36.86 \pm 1.44 \mu\text{m}^2$  respectively. While the cell doubling time obtained was shorter, i.e. 96 hours. For distribution of nuclear DNA content from *in vivo* system, it was observed that most of the cells are in G2 (55.62%) phase, followed by polyploid cells (33.75%) and S (14.37%) phase of the cell cycle. Whereas in the *in vitro* system, the distribution of nuclear DNA content was quite similar with *in vivo* system with most of the cells are in G2 (41.62%), followed by polyploid (38.38%) and S (20%) phase of the cell cycle. Cytological and morphological studies showed that *Z. elegans* was stable in culture even though polyploid cells were observed both in *in vivo* and *in vitro* systems, but no variation or morphological disorder were detected either in cellular stage or at morphological level. The polyploid cells were observed both in *in vivo* and *in vitro* systems because the source of *Z. elegans* explants was taken from the F1 hybrid plant. Therefore polyploid cells were already found in the cell cycle of the intact plant. By exposing the cells to culture conditions, enhance more cells to become polyploid.

The rooting of *Z. elegans* was discovered to be favourable in Murashige and Skoog (MS) media without any hormone additives. Root cultures cannot regenerate shoots in MS (1962) medium supplemented either with BAP alone (0.5 – 3.0mg/l) or in combination with NAA (0.01-3.0mg/l). Nevertheless, other explants sources were also utilized such as leaf, stem, cotyledon and hypocotyl to get an efficient regeneration system for clonal propagation of *Z. elegans* in *in vitro* system. All the explants except the hypocotyl were unable to regenerate shoots in MS medium supplemented with cytokinin alone (0.005 – 5.0mg/l) such as BAP, Kinetin or Thidiazuron (TDZ) or in combination with auxin (0.05 – 5.0mg/l) such as NAA, IAA, IBA or 2,4-D. For shoot multiplication, the optimum medium needed was MS supplemented with 1.0 mg/l Zeatin from the hypocotyl explant. As for *Rosa hybrida* L. var. 'Christian Dior', the rooting was not observed at all throughout the experiment, while for shoot multiplication, the best result was observed on MS medium supplemented with 3.0 mg/l BAP from the axillary bud explant. Other explants such as leaf, stem and petiole were unable to regenerate shoots in MS medium supplemented with BAP alone (1.0 – 5.0mg/l) or in combination with NAA (1.0 – 5.0mg/l).

## ABSTRAK

Kajian kultur tisu telah dilakukan ke atas dua spesies tumbuhan hiasan iaitu *Zinnia elegans* Jacq. dan *Rosa hybrida* L. var. 'Christian Dior'. Untuk kajian kelakuan aktiviti sel, ianya hanya melibatkan spesies *Z.elegans* sahaja. Manakala untuk *R. hybrida* ianya tidak dapat dilakukan kerana ketiadaan biji benih dan akar untuk dijadikan data-data indeks piawai dari sistem *in vivo*. Perubahan di dalam kelakuan aktiviti sel selalu didapati apabila sel-sel atau tisu-tisu dipindahkan dari keadaan *in vivo* kepada *in vitro*. Bagi kebanyakan spesies tumbuhan dikotiledon telah didapati bahawa ciri-ciri sel yang berkeupayaan untuk regenerasi berbeza dengan ciri-ciri sel yang tidak dapat hasilkan regenerasi dan juga berbeza dengan sel-sel dalam tumbuhan induk. Justeru itu tujuan utama kajian sitologi dilakukan adalah untuk memerhatikan aktiviti-aktiviti sel di dalam sistem *in vivo* dan *in vitro* dengan menentukan nilai Indeks Mitosis (MI), bilangan kromosom, kandungan DNA nukleus, tahap ploidi, purata luas sel dan nukleus serta masa penggandaan sel (Cdt) untuk perbandingan. Dengan menilai parameter-parameter ini adalah mudah untuk menentukan kelakuan aktiviti sel bagi tumbuhan dari sistem *in vivo* berbanding sistem *in vitro*. Jika terdapat sebarang perubahan di dalam aktiviti kelakuan sel atau nukleus di dalam sitem *in vitro*, ini memungkinkan kewujudan variasi somaklon. Walaupun demikian jika aktiviti kelakuan sel adalah stabil dan normal keupayaan sel-sel atau tisu-tisu untuk membentuk kalus atau regenerasi membentuk tumbuhan lengkap adalah lebih tinggi.

Dari kajian terhadap *Z.elegans* ke atas pemanjangan akar primer didapati umur yang optima adalah pada hari kelima dengan kepanjangan  $40.82 \pm 15.39$  mm.

Segmen akar ini dengan julat kepanjangan 25.43 – 56.21 mm telah digunakan sebagai panjang piawai untuk kajian sitologi dalam keadaan *in vivo* dan *in vitro*. Kajian sitologi *in vivo* ke atas *Z. elegans* memberikan keputusan nilai indeks mitosis sebanyak  $13.47 \pm 0.46\%$ , bilangan kromosom  $2n = 23$ , purata luas sel dan nukleus sebanyak  $113.55 \pm 4.44 \mu\text{m}^2$  dan  $40.58 \pm 0.95 \mu\text{m}^2$ . Masa penggandaan sel pula adalah 133 jam dalam sistem *in vivo*. Kajian sitologi *in vitro* pula mendapati nilai indeks mitosis adalah  $15.60 \pm 0.20\%$ , bilangan kromosom  $2n = 23$ , purata luas sel dan nukleus sebanyak  $92.40 \pm 5.70 \mu\text{m}^2$  dan  $36.86 \pm 1.44 \mu\text{m}^2$ . Masa penggandaan sel adalah 96 jam sahaja. Taburan kandungan DNA nukleus di dalam sel-sel akar primer *Z. elegans* yang ditanam secara *in vivo* menunjukkan kebanyakan sel-sel berada pada fasa G2 (55.62%). Ini diikuti oleh sel-sel poliploid (33.75%) dan fasa S (14.37%) dan tiada sebarang sel yang berada pada fasa G1(0%). Manakala taburan kandungan DNA nukleus terhadap sel akar primer *Z. elegans* yang ditanam secara *in vitro* pula didapati kebanyakan daripada sel-sel ini berada pada fasa G2 (41.62%), ini diikuti oleh poliploid (38.38%) dan fasa S (20%). Pengukuran kandungan DNA nukleus menunjukkan terdapatnya kehadiran poliploid di dalam sistem *in vivo* dan *in vitro*. Dengan mendedahkan sel-sel kepada persekitaran *in vitro*, menambahkan lagi peratus sel-sel poliploid. Ini berkemungkinan kerana biji benih *Z. elegans* yang digunakan dalam kajian ini adalah jenis hibrid. Keadaan poliploid ini hanya kelihatan pada peringkat genotip sahaja dan bukannya pada peringkat fenotip.

Bagi *Z. elegans*, media optima untuk pembentukan akar adalah media Murashige dan Skoog (MS) tanpa hormon. Eksplan akar didapati tidak berupaya untuk regenerasi di dalam media MS samada dengan BAP sendirian (0.5 – 3.0mg/l) atau kombinasi dengan NAA (0.01 – 3.0mg/l). Walau bagaimanapun selain

menggunakan eksplan akar, eksplan-eksplan lain turut digunakan seperti daun, batang, kotiledon dan hipokotil. Kesemua eksplan ini kecuali eksplan hipokotil didapati tidak berupaya untuk regenerasi lengkap pada media MS yang dibekalkan samada dengan sitokinin sendirian (0.005 – 5.0mg/l) seperti BAP, Kinetin dan Thiadizuron (TDZ) atau kombinasi dengan auksin (0.05 – 5.0mg/l) seperti NAA, IAA, IBA dan 2,4-D. Manakala untuk penggandaan pucuk adalah paling sesuai menggunakan media MS yang telah ditambah dengan 1.0mg/l Zeatin dari eksplan hipokotil. Untuk *Rosa hybrida* L. var. ‘Christian Dior’ pula tiada sebarang akar yang diperolehi sepanjang eksperimen ini dijalankan. Media optima untuk penggandaan pucuk adalah media MS yang telah ditambah dengan 3.0mg/l BAP dari eksplan tunas sisi. Eksplan-eksplan lain seperti daun, batang dan petiol didapati tidak berupaya untuk regenerasi lengkap pada media MS yang dibekalkan dengan BAP sendirian (1.0 – 5.0mg/l) atau kombinasi dengan NAA (1.0 – 5.0mg/l).

menggunakan eksplan akar, eksplan-eksplan lain turut digunakan seperti daun, batang, kotiledon dan hipokotil. Kesemua eksplan ini kecuali eksplan hipokotil didapati tidak berupaya untuk regenerasi lengkap pada media MS yang dibekalkan samada dengan sitokinin sendirian (0.005 – 5.0mg/l) seperti BAP, Kinetin dan Thiadizuron (TDZ) atau kombinasi dengan auksin (0.05 – 5.0mg/l) seperti NAA, IAA, IBA dan 2,4-D. Manakala untuk penggandaan pucuk adalah paling sesuai menggunakan media MS yang telah ditambah dengan 1.0mg/l Zeatin dari eksplan hipokotil. Untuk *Rosa hybrida* L. var. ‘Christian Dior’ pula tiada sebarang akar yang diperolehi sepanjang eksperimen ini dijalankan. Media optima untuk penggandaan pucuk adalah media MS yang telah ditambah dengan 3.0mg/l BAP dari eksplan tunas sisi. Eksplan-eksplan lain seperti daun, batang dan petiol didapati tidak berupaya untuk regenerasi lengkap pada media MS yang dibekalkan dengan BAP sendirian (1.0 – 5.0mg/l) atau kombinasi dengan NAA (1.0 – 5.0mg/l).