

BAB I

1.0 PENGENALAN

Industri bunga-bungaan adalah salah satu daripada sektor pertanian di Malaysia yang boleh menyumbang ke arah peningkatan dan perkembangan ekonomi. Industri bunga-bungaan di Malaysia meliputi bunga iklim sederhana seperti kekwa, ros, teluki, orkid dan tanaman hiasan. Industri orkid adalah industri bunga-bungaan yang pertama dibangunkan di Malaysia iaitu pada tahun 1928, diikuti dengan bunga iklim sederhana dan tanaman hiasan pada lewat tahun 1985 dan 1990. Ini terbukti dengan peningkatan keluasan tanaman bunga-bungaan di Malaysia iaitu daripada 1,118 ha pada tahun 1989 telah meningkat kepada 1,386 ha pada tahun 1990. Amerika Syarikat adalah terkenal sebagai pengimport utama dan terbesar industri bunga-bungaan dari Malaysia diikuti Jepun dan Hong Kong (Nor Auni, 1996).

Antara cabaran yang dihadapi dalam industri ini adalah persaingan dari segi mutu dan varieti baru dari negara luar seperti Belanda, Colombia, Thailand dan Singapura. Manakala dari segi kos pengeluaran dan tenaga buruh pula Malaysia sukar bersaing dengan negara Indonesia dan Thailand yang jauh lebih murah berbanding dengan Malaysia (Nor Auni, 1996). Tidak ramai pengusaha yang ingin menceburkan diri dalam bidang ini kerana ia memerlukan modal yang tinggi serta menghadapi masalah dalam sistem pemasaran dan teknologi kerana persaingan dari pengeksport di Belanda, Israel, Colombia dan Denmark. Negara-negara ini bergabung membentuk satu konsortium untuk memasarkan hasil

keluaran mereka serta dapat bersaing dan memenuhi piawaian dan permintaan dari Eropah dan Jepun (Nor Auni, 1996). Walau bagaimanapun potensi dan prospek industri bunga-bungaan di Malaysia masih mempunyai masa hadapan yang cerah. Sebab utamanya adalah negara-negara maju seperti Belanda dan Jepun sedang menghadapi masalah kekurangan kawasan tanah pertanian dan tenaga buruh serta kenaikan kos pengeluaran akibat kos buruh yang mahal dan kos sara hidup yang tinggi.

Justeru itu teknik pembiakan kultur tisu merupakan komponen yang amat penting dalam industri pertanian masa kini khususnya bagi tanaman hiasan atau bunga-bungaan. Ini kerana teknik ini berupaya menghasilkan bahan tanaman yang bermutu tinggi dengan banyak dalam masa yang singkat, seragam, bebas dari penyakit dan virus serta dengan kos yang rendah. Ini akan meningkatkan lagi mutu, kualiti, daya saing dari segi kos pengeluaran, kos buruh dan memenuhi piawaian dan permintaan pasaran dunia serta berupaya meningkatkan lagi perkembangan dan kemajuan industri bunga-bungaan di Malaysia. Antara bunga-bunga yang penting dari segi ekonomi tetapi kurang dikaji dari aspek kultur tisu ialah *Zinnia elegans* Jacq. dan *Rosa hybrida* Linn. *Zinnia* merupakan tanaman yang diimport tetapi sangat berpotensi untuk ditanam secara komersial di Malaysia. Sementara *Rosa hybrida* memang telah ditanam dengan banyak di Malaysia tetapi kaedah kultur tisu untuk *Rosa hybrida* tidak digunakan dengan meluas di Malaysia. Dalam kajian ini kedua-dua spesies telah dipilih untuk melihat samada teknik kultur tisu boleh menjadi teknik yang berkesan untuk mengembangkan lagi industri bunga-bungaan di Malaysia khasnya menggunakan kedua-dua spesies ini.

1.1 PENGENALAN *Zinnia elegans* Jacq.

Taksonomi

Zinnia elegans Jacq. merupakan spesies tanaman hiasan, berikut adalah kedudukannya dari segi taksonomi mengikut Keng (1986) :

Divisi : Spermatophyta

Subdivisi : Angiospermae

Kelas : Dicotyledoneae

Order : Campanulales (Synandrae)

Famili : Compositae (Asteraceae)

Subfamili : Asteroideae (Tubuliflorae)

Tribus : Heliantheae

Famili Compositae

Merupakan famili yang terbesar dalam tumbuhan berbiji atau berbunga. Boleh didapati di seluruh dunia dan terdapat lebih dari 1000 genus di mana kira-kira tiga puluh peratus daripada genus ini adalah tumbuhan asli yang kebanyakannya terdiri daripada rumpai. Terdapat 20 000 spesies dalam famili ini (Benson, 1976).

Kebanyakan ahli-ahli dalam famili ini mempunyai nilai komersial dan hortikultur yang tinggi seperti *Cosmos sulphureus* Cav., *Coreopsis drummondii*, *Chrysanthemum morifolium* Ram., *Dahlia pinnata* Cav., *Gerbera jamesonii*, *Helianthus angustifolius*, *Tagetes erecta* L. dan *Zinnia elegans* Jacq. Ahli-ahli

1.1 PENGENALAN *Zinnia elegans* Jacq.

Taksonomi

Zinnia elegans Jacq. merupakan spesies tanaman hiasan, berikut adalah kedudukannya dari segi taksonomi mengikut Keng (1986) :

Divisi : Spermatophyta

Subdivisi : Angiospermae

Kelas : Dicotyledoneae

Order : Campanulales (Synandrae)

Famili : Compositae (Asteraceae)

Subfamili : Asteroideae (Tubuliflorae)

Tribus : Heliantheae

Famili Compositae

Merupakan famili yang terbesar dalam tumbuhan berbiji atau berbunga. Boleh didapati di seluruh dunia dan terdapat lebih dari 1000 genus di mana kira-kira tiga puluh peratus daripada genus ini adalah tumbuhan asli yang kebanyakannya terdiri daripada rumpai. Terdapat 20 000 spesies dalam famili ini (Benson, 1976).

Kebanyakan ahli-ahli dalam famili ini mempunyai nilai komersial dan hortikultur yang tinggi seperti *Cosmos sulphureus* Cav., *Coreopsis drummondii*, *Chrysanthemum morifolium* Ram., *Dahlia pinnata* Cav., *Gerbera jamesonii*, *Helianthus angustifolius*, *Tagetes erecta* L. dan *Zinnia elegans* Jacq. Ahli-ahli

dalam famili ini juga berguna sebagai tanaman sayur-sayuran seperti *Lactuca sativa* L., *Cynara scolymus* L. dan *Helianthus tuberosus* L. (Keng, 1986).

Subfamili Asteroideae

Di bawah famili Compositae terdapat dua subfamili iaitu Asteroideae dan Lactucoideae. Bagi tumbuhan di bawah subfamili Asteroideae, pokoknya tiada cairan sel bersusu dan selalunya mempunyai saluran minyak. Korola bunganya berbentuk serombong ceper floret atau dengan dua bibir serta tidak ligulat. Di bawah subfamili ini terdapat 12 tribus. Genus *Zinnia* berada di bawah tribus Heliantheae. Antara genus tanaman hiasan yang berada di bawah subfamili ini ialah *Aster*, *Chrysanthemum*, *Gerbera*, *Tagetes*, *Dahlia*, *Helianthus* dan *Zinnia* (Keng, 1986).

Tribus Heliantheae

Tribus Heliantheae mempunyai jambak kepala bunga yang jarang sekali serbasama. Brakteanya berinvoluker dan selalunya bertindih dalam beberapa baris. Floret disokong oleh braktea sisik dan korola berada di dalam floret dan mempunyai lima cuping pendek. Biasanya bewarna kuning dan cepu debunganya bulat di pangkal atau runcing tanpa ekor. Manakala cabang-cabang benang sarinya berapendej dan berbulu. Antara genus-genus yang terdapat dalam tribus ini adalah *Cosmos*, *Coreopsis*, *Dahlia*, *Helianthus* dan *Zinnia* (Keng, 1986).

Morfologi *Zinnia elegans* Jacq.

Zinnia atau nama saintifiknya *Zinnia elegans* Jacq. adalah dari famili Compositae. Tumbuhan herba semusim ini berasal dari Mexico, mempunyai batang yang kesat dan berbulu halus. Daunnya tanpa petiol dan berbentuk jantung iaitu bujur dan tirus dihujung. Urat-urat daunnya memanjang dari pangkal hingga ke hujung daun. Bunganya selapis atau berlapis-lapis serta mempunyai pelbagai warna terdiri daripada kuning, merah, putih dan ungu. Banyak kacukan telah dilakukan dan agak sukar untuk mengenali jenis-jenisnya. Pokok ini boleh dibiakkan dengan menggunakan biji benih (Ismail, 1993).

Bunganya boleh berkembang dan membesar sehingga diameternya mencapai 10 cm. Batangnya pula boleh mencapai tinggi sehingga 1m. Biasanya berbunga pada bulan Mei hingga Oktober dan boleh diinduksikan supaya berbunga awal. Tumbuhan ini tumbuh subur di negara yang bercuaca panas dan akan berbunga awal jika masa siangnya pendek dan akan menghalang atau melambatkan perkembangan kudup bunga jika masa siangnya panjang (Halevy, 1985).

Zinnia adalah tumbuhan semusim berherba yang hidup subur di cuaca panas. Biji benihnya bercambah dalam masa seminggu pada suhu 20-30°C dan kadang kala mempunyai respon terhadap cahaya. Bunganya mempunyai pelbagai varieti yang menarik menyerupai bunga daisy dan selalunya bersaiz besar. Mempunyai pelbagai warna yang menarik seperti putih, ungu, oren, kuning, merah dan merah jambu (Squire, 1991).

1.2 PENGENALAN *Rosa hybrida* Linn. varieti Christian Dior

Taksonomi

Satu lagi spesies tanaman hiasan yang telah dipilih dalam kajian ini ialah *Rosa hybrida* Linn. varieti Christian Dior. Mengikut Keng (1986) dari segi taksonomi ia boleh dikelaskan seperti berikut :

Divisi : Spermatophyta

Subdivisi : Angiospermae

Kelas : Dicotyledoneae

Order : Rosales

Famili : Rosaceae

Subfamili : Rosoideae

Genus : Rosa

Spesies : hybrida

Varieti : Christian Dior

Morfologi *Rosa hybrida* Linn. varieti Christian Dior

Spesies ini mempunyai bunga yang berwarna merah anggur atau merah krimson seperti baldu, saiz bunganya sangat besar dan selalunya berbunga secara individu atau sekuntum. Batangnya panjang, berduri dan berakhir dengan pengeluaran kudup bunga. Bunganya biasa telah digunakan di dalam pameran atau pertandingan dan sebagai tanaman pasuan atau hiasan taman (Le Grice, 1971).

Mengikut Pearson, (1964) tekstur bunganya adalah seperti baldu, pertumbuhannya tinggi menegak dan mempunyai mata tunas yang tajam. Menurut Wescott, (1965) pula bunganya bewarna merah baldu, bersaiz besar, petal berlapis dan berbau harum. Pertumbuhan batangnya menegak, berduri dan berbunga sepanjang tahun. Tanaman ini tidak tahan kepada persekitaran yang mempunyai kelembapan yang tinggi dan mudah diserang oleh penyakit kulat terutamanya kulapok berdebu.

Famili Rosaceae

Terdapat kira-kira 120 genus dalam famili ini, taburan dan penyebarannya adalah kosmopolitan tetapi didapati dengan banyaknya terutama di kawasan beriklim sederhana di hemisfera utara (Rendle, 1959; Jones dan Luchsinger, 1986; Keng, 1986). Lapan genera telah merupakan tumbuhan asli di Malaysia. *Rosa* dan *Fragaria* telah dibawa masuk dari luar negara dan ditanam dinegeri ini. Terdapat enam subfamili pada umumnya iaitu Rosoideae, Prunoideae, Chrysobalanoideae, Spiraeoideae, Pyroideae (Pomoideae) dan Neuradoideae. Kebanyakan genera di Malaysia terdiri dari empat subfamili sajai iaitu Rosoideae, Prunoideae, Chrysobalanoideae dan Pyroideae (Keng, 1986).

Mengikut Porter (1967), Benson (1976) serta Jones dan Luchsinger (1986) terdapat 3000 spesies di bawah famili *Rosaceae* dan kebanyakannya generasi yang mempunyai nilai komersial terdiri dari pokok buah-buahan seperti epal (*Malus sylvestris* Mill.), pear (*Pyrus communis* L.), quince (*Cydonia* sp.), cherry, plum, prune, peach, nectarine, apricot, almond (*Prunus* spp.), strawberry

(*Fragaria vesca* L.), raspberry, blackberry (*Rubus spp.*) dan loquat (*Eriobotrya sp.*); dan tanaman hiasan seperti ros (*Rosa hybrida* L.), cotoneaster (*Cotoneaster pannosa*), mountain ash (*Sorbus sp.*), bridal wreath (*Spiraea prunifolia*), firethorn (*Pyracantha angustifolia*), quince (*Chaenomeles sp.*) dan cinquefoil (*Potentilla sp.*).

Kebanyakan famili *Rosaceae* terdiri dari pohon atau pokok renik dan jarang sekali pokok herba. Berdaun tunggal atau daun majmuk, berselang dan mempunyai stipul (Porter, 1967; Keng, 1986). Bunganya selalu sebentuk dan dwiseks. Kaliks berbentuk serombong bercuping lima dan dilapisi oleh satu piring yang mempunyai lima ranggi. Stamennya banyak, ovarinya mempunyai satu atau lebih karpel, bercerai atau bercantum dipangkal, selalunya ada dua ovul dalam tiap-tiap satu ovari dan satu atau lebih benangsari. Buahnya jenis drup, pom atau aken. Bijinya mempunyai endosperma yang nipis atau tidak ada langsung (Keng, 1986).

Genus *Rosa*

Genus *Rosa* adalah tumbuhan renik berkayu di bawah subfamili Rosoideae. Pertumbuhan batangnya menegak, memanjang atau melilit. Batangnya dipenuhi duri, licin dan berbulu halus. Daunnya berselang, pinnat ganjil, bergerigi dan mempunyai stipul adnat atau terlekat pada petiol (Genders, 1965). Bunganya mempunyai pelbagai bentuk iaitu dari berbentuk ringkas 5 petal sehinggalah kepada banyak petal atau berlapis-lapis (Moody, 1992).

Mengikut Hasek (1980), genus *Rosa* telah dipercayai berasal dari negara temperat di hemisfera utara merangkumi Eropah, Amerika Utara, Asia Tengah, Asia Timur dan Timur Tengah (Sala, 1991; Moody, 1992). Dari sini, ia telah dibawa masuk dan diperkenal ke hemisfera selatan. Di bawah genus ini terdapat sekurang-kurangnya 200 spesies (Genders, 1965; Hasek, 1980).

1.3 Kajian Kultur Tisu dan Kepentingannya

Pada tahun 1838 teori totipotensi telah dikemukakan oleh Schwan dan Schleiden iaitu setiap sel ialah unit hidup yang bebas dan berkeupayaan untuk membentuk organ tertentu atau tumbuhan lengkap. Sel-sel yang telah membeza pada suatu organisma multisel masih mengandungi maklumat yang wujud dalam sel tunggal yang pertama iaitu sel telur yang tersenyawa. Asas kultur tisu inilah yang membawa kepada perkembangan kultur tisu sehingga hari ini (Teo, 1992).

Di dalam kajian kultur tisu kebiasaannya setiap eksplan atau bahagian tanaman seperti pucuk, daun, akar, batang, petiol dan sebagainya mempunyai keupayaan untuk membentuk satu individu tumbuhan yang lengkap berdasarkan teori totipotensi (Staba, 1980). Mengikut Lyndon (1990) di dalam tumbuhan, sel-sel dari tisu yang berlainan seperti dari sel mesofil daun, sel epidermis daun, sel floem sekunder, sel dari tisu batang, kambium, petal, ovul dan nuselus kesemuanya berkeupayaan untuk diregenerasikan. Kesemua sel tumbuhan ini jika masih ada nukleus adalah bersifat totipoten iaitu berkeupayaan menghasilkan semua jenis sel dan boleh membentuk satu organisma yang lengkap di bawah keadaan kultur yang sesuai. Walau bagaimanapun tiap-tiap jenis eksplan ini

mempunyai peratus regenerasi atau pembentukan pucuk dan akar yang berbeza serta mempunyai kegunaan yang khusus atau spesifik untuk sesuatu spesies tanaman di mana ini akan menentukan jenis sesuatu kultur yang dihasilkan itu.

Teknik pembiakan melalui kultur tisu mempunyai banyak kelebihan berbanding dengan kaedah pembiakan konvensional atau tampang dan biji benih. Di antaranya yang paling utama ialah pembiakan melalui kultur tisu mempunyai kadar pembiakan yang tinggi dalam jangkamasa yang singkat contohnya seperti kultur tisu orkid *Dendrobium* yang boleh menghasilkan 40, 000 anak pokok daripada satu eksplan dalam masa setahun (Arditti, 1993).

Teknik ini juga boleh menghasilkan sumber tanaman yang bebas daripada penyakit dan jangkitan mikrorganisma seperti penggunaan kultur meristem. Tanaman yang terhasil juga adalah seragam dan sekata dari segi saiz, pertumbuhan dan hasil. Pengeluaran bahan tanaman juga boleh dibuat pada bila-bila masa dan keadaan serta boleh disimpan secara kriopreservasi untuk digunakan bila dikehendaki.

Bagi tanaman yang sukar dibiakkan dengan cara biasa atau biji benih dan sukar didapati seperti tanaman orkid, pokok hutan dan pokok yang diancam kepupusan, teknik kultur tisu boleh digunakan untuk mengatasi masalah ini. Bagi tanaman hiasan pula teknik konvensional untuk menghasilkan satu varieti baru adalah melalui kacukan yang mengambil masa yang panjang tetapi melalui teknik kultur tisu cara untuk mendapatkan varieti baru adalah lebih mudah dan cepat.

1.4 Kajian Kultur Tisu Ke Atas Famili Compositae

Teknik kultur tisu tumbuhan telah lama dikenali sebagai satu kaedah yang sangat berkesan untuk mikropropagasi atau pengklonan (George dan Sherrington, 1984), tetapi untuk menghasilkan regenerasi lengkap sesuatu tumbuhan yang memenuhi ketepatan dari segi ciri-ciri genetik atau genotipnya adalah sukar di mana pembentukan kalus hendaklah dielakkan (Gonzalez-Benito *et al.*, 1996). Terdapat banyak kajian yang telah melaporkan tumbuhan yang diregenerasikan melalui kaedah *in vitro* mempunyai kromosom yang bukan homolog pada frekuensi yang tinggi. Keadaan ini dapat dilihat melalui pembentukan multivalen pada peringkat meiosis (Orton dan Steidl, 1980; Davies *et al.*, 1986).

Sebagaimana yang diketahui penghasilan sesuatu hibrid interspesifik pada peringkat F1 adalah sukar dan terhad (Whelan, 1978). Ini adalah kerana kebanyakan biji benih hibrid adalah mandul di mana endosperma gagal untuk membentuk secara normal. Keadaan ini adalah disebabkan bilangan kromosom yang berlainan bagi kacukan antara 2 spesies yang berlainan boleh menyebabkan kegagalan kromosom untuk berpasangan pada peringkat meiosis atau kerana ketidakserasan genetik (Stebbins, 1958). Oleh itu penggunaan dan aplikasi teknik kultur tisu embrio berupaya menghasilkan hibrid ini (Krauter *et al.*, 1991).

Selepas kejayaan awal Morel (1964) terhadap kultur meristem *Cymbidium*, penggunaan teknik kultur tisu semakin berkembang luas untuk mikropropagasi tanaman hiasan, sayur-sayuran, buah-buahan, ubat-ubatan dan spesies-spesies pokok hutan (Vasil, 1986; Debergh dan Zimmerman, 1990). Seterusnya teknik ini

berkembang maju di dalam aplikasi lain seperti pengindeksan virus dan penghasilan bahan tanaman yang bebas patogen seperti pada tanaman ubi kentang, tebu, bawang putih, pisang dan beberapa spesies tanaman hiasan (Wang dan Hu, 1980).

Kebanyakan tanaman hiasan untuk kegunaan seni taman atau bunga keratan batang dari famili Compositae. Terdapat banyak kajian kultur tisu ke atas famili Compositae yang melibatkan penghasilan atau pengklonan hibrid-hibrid terbaru ataupun kultivar. Reynoard *et al.* (1993) dalam kajiannya terhadap *Gerbera hybrida* Bol. L. mendapati eksplan daun yang dikultur pada media MS terubahsuai yang ditambah dengan $10.0\mu\text{M}$ BAP dan $2.5\mu\text{M}$ NAA berjaya memperolehi regenerasi pucuk berganda. Pembentukan akar pucuk ini berjaya diperolehi pada media MS dengan kepekatan separuh yang ditambah dengan $0.25\mu\text{M}$ NAA dalam masa 3 minggu pengkulturan.

Pugliesi *et al.* (1993) pula memperolehi regenerasi pucuk *Helianthus tuberosus* dan *H. annuus* X *H. tuberosus* dengan menggunakan eksplan kotiledon pada media MS yang telah ditambah dengan 4.0 mg/l BAP atau Kinetin dengan 0.5 mg/l IAA. Sembilan puluh peratus daripada pucuk ini berakar pada media MS dengan kepekatan separuh tanpa hormon. Regenerasi lengkap plantlet *H. annuus* telah banyak dilaporkan boleh diperolehi daripada eksplan embrio yang belum matang (Alissa *et al.*, 1986; Finer, 1987; Wilcox *et al.*, 1988; Espinasse dan Lay, 1989), hipokotil (Paterson dan Everett, 1985) dan kotiledon (Power, 1987; Pugliesi *et al.*, 1991). Keupayaan regenerasi yang tinggi menggunakan eksplan daun telah banyak dilaporkan dari famili Compositae seperti *Chrysanthemum*

(Kaul *et al.*, 1990; Bhattacharya *et al.*, 1990), *Crepis* (Brossard, 1979), *Helianthus* (Greco *et al.*, 1984; Paterson dan Everett, 1985) dan *Cichorium* (Dubois *et al.*, 1991).

Mujib dan Pal (1995) dalam kajiannya terhadap *Dianthus caryophyllus* cv. Royal Crimson dan Candy Sim mendapatkan penggunaan 0.5 mg/l BAP pada media MS telah berjaya menghasilkan bilangan pucuk yang banyak. Sankhla *et al.* (1995) pula mendapatkan di dalam kajiannya terhadap *D. caryophyllus* cv. German Red melaporkan penggunaan TDZ didapati lebih efektif daripada BAP untuk menginduksi pucuk. Eksplan petal, sepal serta daun kedua dan ketiga dari pucuk menunjukkan keupayaan regenerasi yang lebih baik berbanding dengan eksplan lain pada media MS yang ditambah dengan 3.0 μ M 2,4-D dengan 2.4 μ M Kinetin.

Umur fisiologi eksplan selalunya berkait rapat dengan keupayaan regenerasi tumbuhan seperti yang telah dilaporkan pada *Cucumis sativus* (Colign-Hooymans *et al.*, 1994). Dalam spesies ini eksplan kotiledon yang muda telah digunakan di mana DNA nukleusnya adalah normal dan keupayaan regenerasinya adalah tinggi. Manakala pada tisu yang tua terdapat peningkatan yang mendadak pada bilangan sel dengan kandungan DNA yang tinggi. Keupayaan regenerasinya juga adalah rendah. Keadaan yang serupa juga telah dilaporkan pada *Daucus carota* L. (Coutus-Thevenot *et al.*, 1990) dan pada spesies *Nicotiana* (Nuti-Ronchi *et al.*, 1981).

Penentuan umur fisiologi eksplan yang optima telah dilaporkan sebagai faktor yang amat penting untuk mendapatkan regenerasi lengkap pada *Helianthus*

annuus (Fiore *et al.*, 1997). Paterson dan Everett (1985) pula memperolehi regenerasi lengkap yang terbaik dengan menggunakan eksplan hipokotil yang berusia 11 hari. Knittel *et al.* (1991) dalam kajiannya mendapat regenerasi yang terbaik dengan menggunakan eksplan kotiledon yang berusia 4-5 hari dari spesies yang sama. Manakala Pugliesi *et al.* (1993) pula memperolehi keputusan yang terbaik pada *Helianthus annuus* dengan menggunakan eksplan kotiledon yang berusia 2 hari.

Penggunaan anak benih atau tisu muda sebagai eksplan untuk mendapatkan organogenesis secara *in vitro* adalah berbeza bagi setiap spesies tumbuhan kerana proses ini dikawal oleh hormon tumbesaran (Doerschug dan Miller, 1967; Webb dan Torres, 1984) dan faktor-faktor lain yang boleh memanipulasikan keadaan yang mempengaruhi pembentukan kalus dan kultur sel pada kebanyakan spesies tumbuhan (Sharma *et al.*, 1990; Bonneau *et al.*, 1994).

Das *et al.* (1995) memperolehi regenerasi lengkap *Trema orientalis* menggunakan eksplan daun anak benih yang berusia 15 hari melalui fasa kalus pada media MS yang telah ditambah dengan 2.5 mg/l BAP dan 0.25 mg/l NAA. Proses pembentukan akar pula diperolehi setelah dipindah ke media MS separuh kepekatan dengan penambahan 0.01 mg/l NAA atau 0.01 mg/l IBA. Gonzalez-Benito *et al.* (1996) juga memperolehi pucuk berganda daripada eksplan ruas batang *Antirrhinum majus* ssp. *barrelieri* dan *A. microphyllum* pada media MS yang ditambah dengan 5.0 μ M BAP. Pucuk-pucuk ini boleh membentuk akar pada media MS tanpa hormon.

1.5 Kajian Kultur Tisu Ke Atas Famili Rosaceae

Pembentukan kalus

Dalam kajian kultur tisu, pembentukan kalus adalah salah satu perkara asas yang amat penting. Ini kerana daripada pembentukan kalus maka terbentuknya organogenesis atau somatik embriogenesis dan seterusnya pembentukan regenerasi tumbuhan lengkap. Tisserat (1985) mengatakan di dalam kebanyakan genera tumbuhan, pembentukan kalus boleh merupakan syarat utama sebelum sesuatu sistem regenerasi tumbuhan yang lengkap diperolehi.

Kalus adalah tisu yang diperolehi daripada sel-sel yang belum membeza. Kalus boleh diinduksikan dengan penggunaan hormon auksin seperti asid 2,4-diklorofenoksi asetik (2,4-D), asid α – naftalena asetik (NAA) dan asid indol 3-asetik (IAA). Pikloram iaitu sejenis auksin sintetik juga didapati berkesan untuk menginduksi kalus (Fitch dan Moore, 1990). Kepekatan yang digunakan adalah berbeza berdasarkan jenis hormon dan juga jenis eksplan yang terlibat.

Ishioka dan Tanimoto (1990) telah melaporkan penggunaan $10.0\mu M$ NAA telah berjaya menginduksikan kalus pada *Rosa damascena* Mill. daripada eksplan ruas batang. Penggunaan 2,4-D pada kepekatan yang tinggi iaitu pada $50\mu M$ dan $200\mu M$ juga didapati berjaya menginduksikan kalus embriogenik pada *Rosa chinensis minima* ‘Baby Katie’ (Hsia dan Korban, 1996) dan *Rosa hybrida* L. ‘Moneyway’ (Van der Salm *et al.*, 1996).

Khosh-Khui dan Sink (1982a) pula mendapati penggunaan 2,4-D tanpa kombinasi dengan hormon lain ke atas *Rosa menatti* Hort. dan *Rosa hybrida* L. ‘Tropicana’ tidak berjaya untuk menginduksi kalus daripada eksplan daun dan batang. Perkara yang sama juga berlaku pada kebanyakan kultivar kacukan *Rosa hybrida* L. dengan menggunakan embrio yang belum matang untuk mendapatkan kalus dengan kepekatan $1.0\mu\text{M}$ NAA (Burger *et al.*, 1990).

Selain auksin, sitokinin juga berfungsi di dalam pembentukan kalus. Khosh-Khui dan Sink (1982) mendapati apabila media asas MS (Murashige dan Skoog) ditambah dengan $9.1\mu\text{M}$ 2,4-D, $1.2\mu\text{M}$ Kinetin dan 2.0 mg/l kasein hidrolisat (CH), pertumbuhan kalus yang rapuh atau mudah pecah diinduksikan dengan cepat pada *Rosa menatti* Hort. dan *Rosa hybrida* L. ‘Tropicana’. Pembentukan kalus yang serupa juga didapati pada media asas Schenk dan Hildebrandt (1972) yang ditambah dengan $2.3\mu\text{M}$ 2,4-D, $10.7\mu\text{M}$ 4-CPA (asid p – kloronofenoksi asetik) dan $0.5\mu\text{M}$ Kinetin.

Lloyd *et al.* (1988) mendapati pada kepekatan $0.5 - 1.6\mu\text{M}$ NAA dan $4.4 - 8.9\mu\text{M}$ BAP, pembentukan kalus boleh berlaku daripada eksplan ruas batang pada *Rosa persica* x *Rosa xanthina*. Burger *et al.* (1990) pula melaporkan penggunaan embrio yang belum matang pada kebanyakan *Rosa spp.* yang dikajinya, membentuk kalus pada kombinasi hormon $1.0\mu\text{M}$ BAP dan $0.5\mu\text{M}$ NAA.

Rout *et al.* (1992) juga memperolehi pembentukan kalus daripada eksplan daun dengan kombinasi hormon $2.2\mu\text{M}$ BAP dan $0.54\mu\text{M}$ NAA serta eksplan ruas batang dengan kombinasi hormon $8.9\mu\text{M}$ BAP dan $26.9\mu\text{M}$ NAA pada *Rosa*

hybrida L. ‘Landora’. Noriega dan Sondahl (1991) pula memperolehi kalus embriogenik yang tinggi daripada eksplan filamen dengan kombinasi hormon $9.1\mu\text{M}$ 2,4-D dan $6.8\mu\text{M}$ Zeatin pada *Rosa hybrida* L. ‘Royalty’.

Pembentukan pucuk

Regenerasi pucuk terbentuk melalui 2 cara iaitu samada secara terus daripada eksplan atau melalui pembentukan kalus terlebih dahulu sebelum pembentukan pucuk. Di dalam proses pembentukan pucuk peranan sitokinin seperti BAP, Kinetin, TDZ dan Zeatin adalah amat penting (Tisserat, 1985). Pucuk yang diregenerasikan daripada kalus secara *in vitro* boleh menambahkan lagi variasi genetik untuk pemilihan dan penghasilan varieti baru (Scowcroft dan Larkin, 1982).

Kejayaan pertama dalam pembentukan primordia pucuk telah dilaporkan oleh Hill (1967) menggunakan *Rosa hybrida* L. ‘The Doctor’. Primordia pucuk diinduksikan daripada kalus yang didapati melalui eksplan batang dengan penggunaan $4.7\mu\text{M}$ Kinetin dan 1.0 g/l Peptone. Kalus ini kemudian dipindahkan ke media yang mengandungi kombinasi hormon $2.7\mu\text{M}$ NAA, $0.9\mu\text{M}$ Kinetin dan $57.7\mu\text{M}$ GA₃. Bagaimanapun primordia pucuk ini gagal membentuk pucuk sepenuhnya. Lloyd *et al.* (1988) dalam kajiannya terhadap *Rosa persica* x *Rosa xanthina* memperolehi kalus daripada eksplan batang dan seterusnya telah berjaya memperolehi pucuk selepas 4 minggu kalus dipindahkan ke dalam media yang berkepekatan $13.3\mu\text{M}$ BAP dan $0.5\text{-}1.6\mu\text{M}$ NAA. Walau bagaimanapun, peratus regenerasi pucuk menurun selepas 3 kali disubkultur.

Pucuk juga boleh didapati daripada tisu tanpa kalus. Lloyd *et al.* (1988) mendapati organogenesis secara langsung berlaku pada *Rosa persica* x *Rosa xanthina* di mana pucuk ‘adventitious’ terbentuk daripada eksplan daun selepas 6 minggu pengkulturan dalam media yang mengandungi hormon $2.2\mu\text{M}$ BAP. Pada kepekatan BAP yang lebih tinggi iaitu $8.9\mu\text{M}$, beliau mendapati eksplan akar juga berupaya membentuk pucuk ‘adventitious’.

De wit *et al.* (1990) pula menggunakan $0.3\mu\text{M}$ NAA dan $0.5\mu\text{M}$ Kinetin telah berjaya memperolehi embrio somatik daripada kalus yang didapati daripada eksplan akar dengan kepekatan auksin yang rendah pada *Rosa hybrida* L. ‘Domingo’. Valles dan Boxus (1987) mendapati kalus dari eksplan batang hanya akan menghasilkan regenerasi dengan kehadiran BAP yang tinggi iaitu $4.0-22.0\mu\text{M}$ serta dengan ketiadaan IBA. Lloyd *et al.* (1988) pula mendapati pucuk ‘adventitious’ boleh diinduksikan daripada kalus dengan kepekatan hormon $2.0-4.0\mu\text{M}$ BAP dan $0.02\mu\text{M}$ NAA. Keputusan yang sama juga telah diperolehi oleh De Vries dan Du Bois (1988) dengan menggunakan ros hibrid ‘Amanda’.

Pembentukan akar

Eksplan embrio dari varieti ros hibrid ‘Bridal Pink’ berupaya membentuk kalus dan seterusnya membentuk pucuk ‘adventitious’ selepas dikultur beberapa bulan di dalam media MS yang diubahsuai dengan pH 5.8, iaitu pada kepekatan hormon $1.0\mu\text{M}$ BAP dan $0.05\mu\text{M}$ NAA. Pucuk ini membentuk akar dalam media MS tanpa hormon dan dalam media MS yang ditambah dengan $1.0\mu\text{M}$ IBA (Burger *et al.*, 1990).

Kajian awal yang telah dilakukan oleh Burger *et al.* (1990) juga mendapati BAP adalah lebih efektif berbanding Kinetin dan 2iP pada *Rosa hybrida* dari segi morfogenesis. Manakala NAA adalah lebih efektif dari IAA di dalam proses organogenesis. BAP pada kepekatan 10.0 μ M didapati bersifat fitotoksik di mana boleh menyebabkan eksplan bertukar warna menjadi perang dan akhirnya mati.

Eksplan ruas batang dari tumbuhan ‘intact’ dan eksplan daun *in vitro* berjaya menghasilkan pucuk pada *Rosa hybrida* L. cv. Landora. Pucuk diinduksikan dari kalus pada media MS yang diubahsuai dengan penambahan 2.0 mg/l BAP, 0.01 mg/l NAA, 10.0 mg/l GA₃ serta 600 mg/l L-prolina atau 600 mg/l L-glutamina. Pucuk yang terhasil didapati mengeluarkan akar pada media MS cecair yang diubahsuai dengan penambahan 0.1 mg/l NAA selepas 10 hari di dalam kultur (Rout *et al.*, 1991).

Ishioka dan Tanimoto (1990) juga telah berjaya menghasilkan akar dari pucuk ‘adventitious’ yang diperolehi dari kalus melalui eksplan ruas batang pada media MS dengan kepekatan hormon 5.0 μ M IAA. Hsia dan Korban (1996) pula memperolehi akar pada ros ‘Baby Katie’ dengan frekuensi pembentukan akar yang tertinggi menggunakan kalus yang berusia 6 minggu yang berasal dari eksplan daun pada media MS yang diubahsuai dengan penambahan 11.0 -27.0 μ M NAA. Pada ros ‘Red Sunblaze’ pula sebanyak 84% dari eksplan berakar dengan kepekatan hormon 11.0 μ M NAA dan pada ros ‘Carefree Beauty’ hanya 50-54% sahaja yang menghasilkan akar pada kepekatan hormon 11.0 - 27.0 μ M NAA.

1.6 Kajian aktiviti sel ke atas akar primer tumbuhan

Kestabilan genetik untuk spesies-spesies yang dikultur dalam sistem *in vitro* adalah satu prasyarat untuk propagasi kultur tisu bagi genotip yang terpilih. Ini kerana terdapat banyak laporan atau kajian tentang ketidakstabilan genetik di dalam tumbuhan yang diregenerasikan melalui kultur tisu (Partanen, 1963; Nagl, 1974; D'Amato, 1975; Sheridan, 1974; Sunderland, 1977; Skirvin, 1978 dan Bayliss, 1980). Selalunya untuk menentukan ciri-ciri genotip yang terpilih bagi sesuatu spesies tumbuhan seperti kadar pertumbuhan, bentuk bunga, warna bunga, saiz bunga dan keupayaan berbunga ia memerlukan masa yang lama sehingga tumbuhan itu berbunga dan membesar untuk melihat ciri-ciri terpilih ini. Kadangkala ia mengambil masa sehingga 5-10 tahun untuk berbunga dan menghasilkan biji benih bagi spesies tumbuhan yang dikaji untuk pembaikean (Wright, 1976).

Oleh itu untuk memastikan lebih awal genotip yang terpilih ini diwarisi, kajian sitologi adalah amat penting untuk menentukan kejayaan sesuatu regenerasi tumbuhan itu untuk genotip yang terpilih berlaku pada peringkat awal pertumbuhan tanpa menunggu masa yang lama atau menunggu sehingga pokok matang. Walau bagaimanapun dalam sesetengah kes variasi somaklon yang didapati melalui kultur tisu sangat berguna untuk tanaman hiasan dan pokok buah-buahan untuk penghasilan varieti baru (Larkin dan Scowcroft, 1981) dan untuk pembaikean untuk spesies pokok hutan yang ada nilai komersial (Durzan dan Campbell, 1974; Kirby, 1982).

Kajian sitologi atau kajian aktiviti sel bertujuan untuk mengetahui samada sesuatu kultur sel atau tumbuhan yang diregenerasikan daripada sesuatu sistem kultur sel adalah stabil dan normal atau sebaliknya. Kajian ini juga sangat berguna untuk menganalisis samada berlaku sebarang perubahan pada bilangan kromosom seperti aneuploid (keadaan di mana sel-sel mempunyai bilangan kromosom yang berlainan dengan bilangan n atau $2n$) dan poliploid (keadaan di mana sel-sel mempunyai bilangan kromosom yang lebih dari asal) pada sesuatu kultur tisu tumbuhan. Ini kerana didapati frekuensi untuk berlakunya ketidakstabilan kromosom adalah tinggi pada tumbuhan yang diregenerasikan melalui teknik kultur tisu (Evans dan Reed, 1981).

Propagasi melalui teknik *in vitro* mempunyai beberapa kebaikan berbanding dengan cara konvensional. Antaranya adalah kultur tisu boleh digunakan untuk tumbuhan yang teknik pembiakkannya lambat dan mengambil masa yang lama. Propagasi secara klon melalui teknik kultur tisu pertama kalinya digunakan secara komersial pada tanaman orkid. Pembiakan orkid adalah lambat dan teknik kultur tisu dapat mempercepatkan pembiakan ini (Murashige, 1974).

Teknik kultur tisu juga boleh digunakan untuk mengurangkan jangkamasa propagasi untuk spesies-spesies yang mempunyai permintaan yang tinggi dalam pasaran. Sebagai contoh propagasi *in vitro* pada tanaman hiasan lili dan asparagus (Evans *et al.*, 1981) telah terbukti berkesan cepat untuk dibiakkan melalui teknik kultur tisu tetapi masih lagi tidak mencukupi untuk memenuhi pasaran.

Teknik kultur tisu juga berguna untuk menghasilkan varieti baru. Dalam kes ini penanaman dan pembiakan secara komersial dan cepat untuk menghasilkan tanaman yang rentang terhadap virus atau varieti baru adalah sangat penting (Murashige, 1978). Penggunaan kultur meristem untuk menghasilkan bahan tanaman yang bebas dari virus telah diketahui umum. Sebagai contoh pada tanaman tembakau yang disuntik dengan virus mosaik tembakau (TMV) yang diregenerasikan daripada kalus menunjukkan hanya 30-40% daripada sel yang dijangkiti TMV. Virus ini lama kelamaan akan hilang kerana proliferasi sel atau subkultur yang berulang kali dan kerap berbanding dengan replikasi virus (Evans *et al.*, 1981).

Tumbuhan yang terhasil melalui kultur tisu telah terbukti bebas dari serangan perosak dan penyakit. Di dalam beberapa kes ia didapati lebih sihat dan subur, berbunga lebih awal, produktiviti tinggi dan mempunyai ciri-ciri kualiti yang diperlukan (Evans *et al.*, 1981). Sebagai contoh tumbuhan ‘Boston Fern’ yang dibiakkan melalui stolon didapati hanya mempunyai satu pusat tumbesaran. Manakala tumbuhan yang dibiakkan melalui kultur tisu mempunyai beberapa pusat tumbesaran. Ini menambahkan lagi nilai komersial dan hortikultur sesuatu spesies tanaman (Murashige, 1978).

Kejayaan teknik propagasi kultur tisu menggunakan media pepejal atau cecair banyak dilaporkan terhasil daripada penggunaan pelbagai jenis eksplan seperti ovari, ovul, nuselus, embrio, biji benih, akar, batang, rizom, tuber, umbisi, daun, bunga, tisu tumor, tisu meristem, tisu parenkima, endosperma, anter debunga dan protoplas (D’Amato, 1975a; Murashige, 1974). Secara amnya anak

pokok yang diregenerasikan daripada eksplan hujung pucuk melalui teknik kultur tisu adalah homogenous dari segi fenotip dan genetiknya adalah stabil. Cara yang terbaik untuk menentukan kestabilan nukleus dalam teknik pengklonan ini adalah melalui penentuan bilangan kromosom (D'Amato, 1975).

Kajian yang telah dilakukan ke atas *Asparagus officinalis* (Murashige *et al.*, 1972), *Gerbera jamesonii* (Murashige *et al.*, 1974) dan *Hordeum vulgare* (Cheng dan Smith, 1975) mendapati kesemua tumbuhan yang diregenerasikan melalui eksplan hujung pucuk adalah diploid. Manakala kajian yang dilakukan ke atas *Asparagus officinalis* yang diregenerasikan daripada kalus dan sel ampaian didapati tetraploid (Wilmar dan Hellendoorn, 1968; Malnassy dan Ellison, 1970). Pada tanaman *Chrysanthemum* dan "Carnation" pula kimera terbentuk (Earle dan Langhans, 1974; Hackett dan Anderson, 1967). Ini menunjukkan kepentingan kultur tisu menggunakan hujung pucuk untuk mendapatkan kestabilan genetik dan menjamin tumbuhan yang bebas patogen (D'Amato, 1975; Morel, 1975).

Nickel dan Heinz (1973) di dalam kajian mereka terhadap sel dan kultur tisu mendapati variasi yang wujud daripada sel ke sel di dalam kultur tisu dan di antara plantlet boleh berpunca daripada beberapa faktor iaitu seperti variasi yang semulajadi wujud daripada tanaman induk seperti aneuploidi, poliploidi dan kromosom 'mosicism', atau disebabkan oleh pendedahan sel-sel kepada pelbagai komposisi nutrien, hormon dan lain-lain bahan kimia di dalam media yang menyebabkan perubahan dan kemusnahan kromosom serta mutasi. Kemusnahan atau kegagalan tisu-tisu dan organel untuk membentuk sel ampaian juga boleh menyebabkan variasi wujud seperti mutasi.

Multiplikasi atau penggandaan tumbuhan secara *in vitro* boleh terhasil melalui 2 cara iaitu melalui kultur hujung pucuk yang menghasilkan proliferasi pucuk aksilari atau melalui proses somatik embriogenesis. Kultur hujung pucuk mempunyai keseragaman dari segi genetik manakala embriogenesis somatik adalah terhad kepada beberapa spesies tetapi regenerasi tumbuhan adalah cepat (Evans *et al.*, 1981). Terdapat beberapa kajian terdahulu yang menunjukkan berlakunya variasi fenotip pada tumbuhan yang diregenerasikan secara *in vitro*. Keadaan ini sangat berguna dalam bidang pembiakbakaan untuk penghasilan varieti baru tetapi tidak untuk tujuan pengklonan (Heinz *et al.*, 1977)

Kajian yang telah dilakukan ke atas *Geranium* menunjukkan eksplan batang boleh menghasilkan regenerasi yang seragam. Manakala regenerasi yang terhasil melalui eksplan akar, petiol atau daripada kalus adalah berbeza. Perubahan ketara boleh dikesan pada saiz daun, morfologi bunga, kandungan minyak pati dan pigmen antosianin. Pada tomato juga tumbuhan yang boleh diregenerasikan melalui batang didapati seragam tetapi daripada eksplan daun terdapat banyak variasi. Perubahan fenotip selalunya bersangkut paut dengan perubahan pada bilangan kromosom di mana ini akan menunjukkan perubahan genetik (Evans *et al.*, 1981).

Bilangan Kromosom

Ketidakstabilan kromosom pada kultur sel ampaian dan sel kalus telah banyak dilaporkan. Ketidakstabilan ini lebih ketara pada bilangan kromosom berbanding pada struktur kromosom. Bilangan kromosom yang berbeza telah

dilaporkan pada *Nicotiana tabacum* di mana bilangan kromosom yang normal $2n=48$ telah menjadi $2n=35-193$ pada sel kalus. Pada *Haworthia spp.* pula $2n=14$ telah menjadi $2n=14-28$. Pada *Haplopappus gracilis* pula $2n=4$ telah menjadi $2n=3-32$ dan pada *Vicia faba* pula $2n=12$ telah menjadi $2n=11-60$ (Evans dan Reed, 1981).

Terdapat kajian yang menunjukkan tumbuhan yang diregenerasikan daripada sel-sel diploid menjadi tetraploid seperti pada *Asparagus officinalis*, *Brassica oleracea*, *Lilium longiflorum*, *Nicotiana tabacum*, *Oryza sativa* dan *Pelargonium zonale*. Aneuploid pula didapati pada tumbuhan yang diregenerasikan daripada *Lilium longiflorum*, *Nicotiana tabacum*, *Saccharum spp.* dan *Lolium multiflorum*. Keadaan kromosom menjadi diploid dan tetraploid adalah biasa pada tumbuhan yang diregenerasikan daripada eksplan anter. Julat untuk perubahan kromosom berlaku adalah lebih tinggi pada tumbuhan yang diregenerasikan daripada kalus berbanding dengan tanpa kalus. Pada tumbuhan *Hordeum vulgare x H. jubatum* yang telah diregenerasikan daripada kalus dan sel ampaian didapati sel-sel aneuploid banyak terhasil (Evans dan Reed, 1981).

Ketidakstabilan bilangan kromosom ini boleh berlaku seawalnya pada subkultur yang pertama dan menjadi lebih kerap pada kultur jangka panjang. Perubahan yang kerapkali berlaku adalah euploid dan aneuploid iaitu keadaan di mana sel-sel mempunyai bilangan kromosom yang berlainan dengan bilangan haploid (n) atau diploid ($2n$). Poliploid pula terjadi hasil daripada endomitosis dan endoreduplikasi iaitu penggandaan bilangan kromosom tanpa pembahagian nukleus di mana akan menghasilkan poliploid. Sesuatu sel tumbuhan itu dikatakan

poliploid apabila $2n=3x$ (triploid) atau $2n=4x$ (tetraploid) iaitu keadaan di mana bilangan kromosom melebihi bilangan asal. Keadaan pertumbuhan kultur sel secara *in vitro* di mana unsur fosfat adalah terhad dan proses subkultur yang lewat boleh menyebabkan tetraploid berlaku. Selain daripada ketidakstabilan bilangan kromosom, kejadian seperti struktur kromosom yang abnormal juga banyak dilaporkan pada spesies-spesies tumbuhan yang dikultur secara *in vitro*. Kejadian seperti megakromosom iaitu sebahagian daripada struktur kromosom menjadi besar berbanding dengan kromosom-kromosom lain dan isokromosom iaitu semua kromosom mempunyai kecacatan yang sama telah dilaporkan berlaku pada *Triticum monococcum*, *T. aestivum*, *Haplopappus gracilis*, *Daucus carota* dan *Hordeum gracilis*. Pada tumbuhan yang diregenerasikan melalui sel somatik pula terdapat juga laporan yang mengatakan berlakunya aneuploid dan tetraploid. Terdapat juga laporan yang menyatakan kromosomnya adalah normal dan tiada sebarang variasi seperti dalam spesies *Chrysanthemum* (Evans dan Reed, 1981).

Heinz *et al.* (1969) di dalam kajian sitologi terhadap 5 hibrid *Saccharum* sp. mendapati bilangan kromosom adalah stabil pada 4 generasi yang pertama tetapi terdapat perbezaan yang nyata pada generasi yang berikutnya. Di dalam kajian lain pula oleh Tlaskal dan Hutchinson (1974) serta Krishnamurthi dan Tlaskal (1974) terhadap varieti *Saccharum* H50-7209 mendapati pada generasi pertama terdapat variasi pada bilangan kromosom iaitu di antara 71-300. Kebanyakan sel mempunyai julat bilangan kromosom 80-90. Pada generasi kedua pula julat bilangan kromosom adalah di antara 111-140. Pada generasi ketiga pula bilangan kromosom adalah 51-185 dan pada generasi keempat 71-90. Ini menunjukkan terdapat kromosom 'mosaicism' pada tanaman klon tebu tersebut.

Kehilangan atau kemusnahan segmen kromosom akan memberi kesan terhadap kesempurnaan komposisi genetik sesuatu populasi sel. Plantlet yang mengandungi bilangan kromosom yang berganda atau poliploid selalunya terencat pertumbuhannya, kurang subur dan selalunya gagal untuk berbunga, tetapi terdapat juga plantlet yang pertumbuhannya subur dan berbunga (Reinert dan Bajaj, 1977).

Heinz dan Mee (1971) pula menyatakan sebahagian daripada variasi bilangan kromosom adalah disebabkan oleh pembahagian yang tidak seragam pada sel-sel multinukleus. Pada tumbuhan 'intact' juga boleh berlaku variasi pada bilangan kromosom ketika proses meiosis dan mitosis, tetapi kadar variasi adalah lebih tinggi pada kultur *in vitro*. Plantlet yang diperolehi melalui subkultur yang berulangkali juga mempunyai perbezaan dari segi bilangan kromosom dan akan menunjukkan perbezaan dari segi fenotip seperti pertumbuhan yang renek dan kurang subur. Walau bagaimanapun plantlet-plantlet ini bila ditanam di ladang akan tetap stabil dan tidak menghasilkan chimera.

Indeks mitosis (MI)

Dalam kultur kalus selalunya hanya terdapat sedikit sahaja proses mitosis yang berlaku secara aktif. Pada sel-sel kalus indeks mitosisnya adalah rendah iaitu 1%. Manakala indeks mitosis bagi sel ampaian pula biasanya 10-12% bagi kebanyakan spesies tumbuhan kekacang (Evans dan Reed, 1981). Phillips dan Torrey (1972) di dalam kajian mereka mendapati indeks mitosis bagi setiap bahagian zon meristem akar adalah berlainan. Beliau mendapati lapisan pertama

bahagian hujung akar mempunyai indeks mitosis sebanyak 7.5%. Pada lapisan kedua, ketiga dan keempat hujung akar pula mempunyai indeks mitosis yang bernilai 0.46%. Bahagian pusat kuisen iaitu kawasan di mana sel-sel tidak aktif membahagi mempunyai indeks mitosis 0.13% manakala bahagian korteks 3.5%. Mereka telah menggunakan sel hujung akar yang berusia 3-4 hari dengan kepanjangan 15-30mm dan menggunakan larutan kolkisin yang berkepekatan 0.05%.

Kandungan DNA Nukleus

Kawasan di mana tumbesaran berlaku dengan aktif adalah tertumpu pada tisu-tisu meristem seperti pada hujung pucuk, hujung akar, internod dan pada tisu sekunder seperti tisu kambium dan tisu felogen. Sel-sel meristem selalunya bersaiz kecil dan mempunyai bentuk yang hampir serupa atau isodiametrik. Sel-sel ini mempunyai dinding sel yang tebal, nukleus yang besar, kaya dengan sitoplasma, tiada lompong vakuol dan tiada ruang antara sel.

Kitaran hidup sel boleh dianalisis melalui kajian terhadap nukleus seperti kitaran pembahagian mitosis. Kitaran sel ini boleh dibahagikan kepada 2 fasa. Pertama adalah melalui peringkat interfasa yang terdiri dari fasa G1, S dan G2. Fasa G1 adalah fasa prasintesis atau sebelum sintesis DNA berlaku. Fasa S adalah fasa sintesis iaitu di mana sintesis DNA berlaku untuk seterusnya membentuk nukleus dan sitoplasma. Fasa G2 pula adalah fasa selepas sintesis iaitu apabila kandungan DNA berganda. Peringkat interfasa adalah penting untuk penggandaan bilangan kromosom dan DNA nukleus, untuk sintesis RNA dan protein serta

untuk penggandaan isipadu sel. Keduanya adalah melalui pembahagian mitosis yang melibatkan profasa, metaphasa, anafasa dan telofasa.

Kitaran lengkap proses pembahagian mitosis mengambil masa di antara 8-24 jam bagi kebanyakan sel tumbuhan. Jangkamasa bagi setiap fasa pada pembahagian mitosis juga berbeza mengikut spesies tumbuhan. Faktor-faktor seperti suhu, air, oksigen dan kandungan gula juga mempengaruhi pembahagian mitosis. Kekurangan kandungan gula didapati boleh merencatkan fasa S semasa peringkat interfasa. Manakala kekurangan oksigen pula boleh merencatkan keseluruhan proses pembahagian mitosis. Pembahagian mitosis juga boleh dipengaruhi oleh hormon tumbuhan terutamanya sitokinin. Fungsi sitokinin adalah menggalakkan pembahagian sel dan mengatur proses perpindahan protein pada fasa G2 semasa interfasa. Pengiraan indeks mitosis boleh menentukan keupayaan pembahagian keseluruhan sel-sel ini.

Setelah 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 dan DNA nukleus. Fenomena ini dipanggil endoreduplikasi dan membawa kepada pertambahan tahap ploidi. Pembezaan sel dan tisu tumbuhan pula didapati pada pelbagai peringkat. Pembezaan yang berlaku pada setiap sel dan tisu akan membentuk organ. Pada bahagian pucuk, pembezaan yang berlaku akan membentuk batang, daun dan bunga.

Pada tumbuhan pembezaan selalunya tertumpu kepada bahagian akar dan pucuk. Pada tahap penggandaan DNA nukleus juga pembezaan sel boleh berlaku.

Sebahagian daripada sel ini akan melengkapkan pembahagiannya sehingga ke fasa G1, manakala sebahagian sel yang lain akan melengkapkan pembahagiannya sehingga ke fasa G2. Kestabilan genetik dalam kultur tisu tumbuhan boleh ditentukan dengan pelbagai cara. Analisis kariotip adalah salah satu daripada caranya iaitu dengan menilai aktiviti sel pada peringkat mitosis. Cara yang lebih mudah adalah dengan menganalisis kandungan DNA nukleus pada peringkat interfasa. Kaedah ini boleh mengesan tahap ploidi di dalam kandungan DNA nukleus samada berlakunya poliploid, aneuploid atau haploid (Sebanek, 1992).

Variasi genetik seperti perubahan pada tahap ploidi adalah satu perkara yang biasa berlaku pada kultur tisu *in vitro*. Bayliss dan Gould (1974) di dalam kajian mereka terhadap *Acer pseudoplatanus* mendapati aneuploid seringkali berlaku. Wright dan Northcote (1973) pula di dalam kajian mereka terhadap spesies yang sama mendapati tetraploid seringkali berlaku. Murashige *et al.* (1967) melaporkan hanya keadaan diploid sahaja yang diperolehi pada peringkat permulaan kultur *Citrus lemon*. Walau bagaimanapun, selepas satu tahun di dalam kultur keadaan diploid tidak kelihatan sama sekali, hanya sel-sel tetraploid dan oktagonal yang diperolehi.

Pada kultur kalus *Prunus amygdalus* pula hanya sel-sel aneuploid, triploid dan tetraploid yang banyak kelihatan (Mehra dan Mehra, 1974). Mengikut Partanen (1963) pula sebahagian daripada sel-sel poliploid yang terdapat di dalam kultur tisu tumbuhan adalah berhubung kait dengan keadaan sel-sel poliploid yang sedia ada semasa *in vivo*. Sel-sel poliploid biasanya terdapat secara semulajadi di dalam tumbuhan angiosperma (Wright, 1976).

Patel dan Berlyn (1982) pula telah mendapati kandungan DNA nukleus pada *Pinus coulteri* yang dikultur telah meningkat dengan mendadak. Hanya dalam masa 6 minggu di dalam kultur, 80% daripada sel yang diperhatikan mengandungi tahap ploidi yang melebihi 4C – 8C. Renfroe dan Graeme (1984) pula melaporkan keadaan yang berbeza di mana kandungan DNA nukleus embrio dan mata tunas *Pinus taeda* selepas 3 bulan adalah tetap 2C dan 4C tanpa berlaku sebarang poliploid. Kajian terhadap kultur tisu embrio *Pinus lambertiana* mendapati hanya 3% sahaja daripada sel yang menunjukkan tetraploid, manakala 97% daripada sel adalah stabil dan diploid (Partanen, 1963).

Gautheret (1956) mendapati hanya pada kawasan pembezaan sel trakeid *Pinus strobus* yang mengandungi sel-sel tetraploid manakala kawasan kalus yang mengandungi sel-sel meristem adalah stabil dan diploid. Salmia (1975) di dalam kajiannya terhadap *Pinus cembra* mendapati selepas 9 bulan di dalam kultur hanya 14% sahaja sel-sel yang berada dalam keadaan poliploid, tetapi di dalam kultur kalus *Pinus gerardiana*, semua sel didapati diploid setelah 10 minggu di dalam kultur (Konar dan Nagmani, 1972).

Clowes (1965) dan Barlow (1969) telah merumuskan bahawa perbezaan yang wujud di dalam pembahagian mitosis pada pelbagai kawasan di zon meristem akar *Zea mays* adalah disebabkan sel-sel berada terlalu lama pada kawasan pusat kuisen untuk proses prasintesis DNA. Ini menyebabkan kadar mitosis rendah. Kadar mitosis pada fasa-fasa lain di dalam kitaran mitosis didapati adalah sama bagi semua bahagian di zon meristem akar. Thompson dan Clowes (1968) juga melaporkan pemerhatian yang sama dalam kajiannya terhadap akar

Allium sativum. Kebanyakan sel-sel didapati berada di pusat kuisen akar dan lewat memasuki pembahagian mitosis pada tahap 2C dan 2C – 4C pada fasa G1 dan S.

Clowes (1968) di dalam kajiannya terhadap akar *Zea mays* sekali lagi mendapati sebanyak 53% daripada sel berada pada tahap 2C, 43% berada pada tahap 2C - 4C dan 4% berada pada tahap 4C pada bahagian pusat kuisen akar. Daripada keputusan yang didapati beliau telah merumuskan bahawa ketidaan sel-sel pada tahap 2C dan 4C adalah disebabkan kelewatan sel-sel untuk memasuki fasa S atau fasa sintesis dalam pembahagian mitosis. Byrne dan Heimsch (1970) serta Clowes (1958) telah melaporkan pada dua kawasan yang berbeza pada zon meristem akar iaitu pusat kuisen dan hujung akar, sel-sel didapati agak lewat untuk memasuki fasa G1. Dengan ini jelas menunjukkan wujud satu organisasi sel yang kompleks dengan keadaan fisiologi yang berbeza pada setiap bahagian yang berlainan pada zon meristem akar.

Patel dan Berlyn (1982) mendapati kehadiran hormon sitokinin eksogenous di dalam media kultur boleh menyebabkan tahap ploidi semakin meningkat pada *Pinus coulteri* tetapi pada *Pinus taeda* ia adalah normal walaupun kepekatan sitokinin adalah melebihi had optima (Renfroe dan Graeme, 1984). Konar dan Nagmani (1972) telah melaporkan, kehadiran kinetin, 2,4-D dan adenin secara berasingan atau bersama ke atas kultur kalus *Pinus gerardiana* tidak boleh menunjukkan sebarang peningkatan pada tahap ploidi. Terdapat juga kajian yang mengatakan kehadiran sitokinin seperti kinetin boleh menyebabkan sel-sel terinduksi untuk membahagi menjadi tetraploid atau pada tahap ploidi yang lebih tinggi (Torey, 1961; 1965; Torey dan Fosket, 1970).

Patel dan Berlyn (1982) mendapati sebanyak 3% daripada sel-sel kultur embrio *Pinus coulteri* mempunyai tahap ploidi yang melebihi 4C. Pada anak benih *Pinus coulteri* yang berusia 6 minggu yang telah disemai secara *in vivo*, kajian ke atas kandungan DNA nukleus juga mendapati peningkatan sebanyak 3-7% pada tahap ploidi yang melebihi 4C. Dengan ini ketidakstabilan genetik boleh menghalang potensi pengklonan sesuatu spesies tumbuhan, penghasilan hibrid somatik dan penyimpanan germplasma (Renfroe dan Graeme, 1984).

Masa Penggandaan Sel (Cdt)

Clowes (1961) mendapati setiap bahagian pada zon meristem akar *Zea mays* mempunyai masa penggandaan sel yang berlainan. Bahagian hujung akar pada zon meristem didapati mempunyai masa penggandaan sel yang paling singkat iaitu 12 jam. Bahagian pusat kuisen pula mempunyai masa penggandaan sel yang paling lama iaitu 239 jam. Bahagian korteks pula mempunyai masa penggandaan sel di antara 48-55 jam. Barlow (1969) juga mendapat keputusan yang hampir sama terhadap *Zea mays* iaitu masa penggandaan sel bagi bahagian hujung akar ialah 14 jam, manakala bahagian pusat kuisen 370 jam dan bahagian korteks 15-24 jam.

Phillips dan Torrey (1972) di dalam kajian mereka terhadap sel hujung akar *Convolvulus arvensis* yang telah berulang kali disubkultur mendapati jangkamasa kitaran sel adalah 13 jam. Evans *et al.* (1957) mendapati pengumpulan fasa metafasa di dalam sel hujung akar *Vicia faba* yang diperlakukan dengan larutan kolkisin pada kepekatan 0.1, 0.05 dan 0.025%

dengan jangkamasa 1-6 jam adalah sama. Pada 6 jam pertama pengumpulan fasa metafasa pada graf yang didapati adalah linear tetapi selepas 6 jam ia menjadi tidak linear. Ini menunjukkan selepas 6 jam proses metafasa adalah terhenti kerana kebanyakan sel berada pada fasa profasa.

Phillips dan Torrey (1972) pula mendapati tiada sebarang sel yang berada pada fasa metafasa setelah diperlaku dengan 0.05% kolkisin selama 12 jam. Semasa perlakuan 1-5 jam, graf pengumpulan sel-sel yang berada pada fasa metafasa adalah linear tetapi pada perlakuan 5-12 jam ia menjadi tidak linear.

Selain daripada kolkisin sebagai suatu bahan kimia untuk mengukur masa penggandaan sel atau mengira bilangan kromosom serta penggunaan HCl sebagai rawatan untuk proses hidrolisis, Collins (1979) telah menggunakan 3mM 8-hidroksikuinolin selama 4-5 jam pada suhu 16-18°C terhadap rawatan hujung akar *Nicotiana tabacum* sebagai bahan ganti kepada kolkisin.

Evans dan Reed (1981) pula telah menggunakan 0.1% larutan Bromisavalum selama 6-8 jam pada suhu 10°C pada *Pisum sativum*. Walaupun HCl adalah sebagai perawat yang biasa digunakan untuk proses hidrolisis akar tetapi kepekatan, suhu dan jangkamasa proses hidrolisis tersebut adalah berbeza mengikut spesies. Secara amnya, didapati suhu yang tinggi (60°C) selalu digunakan dengan kombinasi masa proses hidrolisis yang singkat serta kepekatan HCl yang rendah. Proses hidrolisis juga boleh menggunakan 0.5% pectinase dan cellulase selama 1-2 jam untuk melengkapkan proses hidrolisis sel akar tumbuhan peringkat tinggi (Evans dan Reed, 1981).

OBJEKTIF KAJIAN

Walaupun banyak terdapat kajian kultur tisu terhadap spesies-spesies dari famili Compositae dan Rosaceae tetapi kepekatan hormon, kombinasi auksin dan sitokin, sumber eksplan serta formulasi media bagi setiap spesies adalah berbeza. Bagi *Zinnia elegans* Jacq. dan *Rosa hybrida* Linn var. "Christian Dior" pula sehingga kini masih kurang atau sangat terhad laporan tentang kajian kultur tisu yang telah dijalankan ke atas kedua-dua spesies ini.

Justeru itu tujuan utama kajian ini dilakukan adalah untuk melihat kesesuaian mikropropagasi secara *in vitro* terhadap kedua-dua spesies tanaman hiasan ini. Pelbagai sumber eksplan telah digunakan seperti daun, batang, akar, petiol dan sebagainya untuk mendapatkan sumber eksplan yang paling responsif. Pelbagai kombinasi hormon auksin dan sitokin seperti BAP, Zeatin, Kinetin, IBA, IAA dan NAA dengan pelbagai kepekatan telah digunakan untuk mendapatkan satu sistem regenerasi lengkap.

Kajian ini juga bertujuan untuk membezakan sistem regenerasi secara *in vitro* di antara tumbuhan berkayu dan herba untuk mengkaji kesan hormon-hormon ke atas morfogenesis, keupayaan regenerasi untuk membentuk plantlet lengkap daripada pelbagai sumber eksplan di dalam usaha untuk mendapatkan bahan tanaman yang bebas dari penyakit dan patogen dalam kuantiti yang banyak, cepat dan murah.

Objektif lain adalah untuk melihat dan membuat perbandingan aktiviti sel di dalam sistem regenerasi *in vitro* dan *in vivo*. Jika terdapat sebarang perubahan pada komposisi sel atau nukleus, ini menunjukkan terdapatnya variasi somaklon. Jika komposisi sel atau nukleus stabil pula, ini berkemungkinan menunjukkan keupayaan regenerasi adalah tinggi.

Bagi menentukan aktiviti sel atau kelakuan sel di dalam sistem *in vivo* dan *in vitro*, parameter-parameter seperti Indeks Mitosis, Bilangan Kromosom, Penentuan Kandungan DNA Nukleus, Penentuan Purata Luas Sel dan Nukleus serta Masa Penggandaan Sel telah diukur. Dengan menilai parameter-parameter ini variasi somaklon dapat dikesan pada peringkat awal sekiranya berlaku dan anak pokok yang terhasil dapat dikesan samada serupa dengan induk dari segi morfologi dan sitologi tanpa menunggu sehingga tempoh masa yang lama atau sehingga anak pokok mencapai tahap reproduktif.