

**PENGAWETAN KRIO SECARA VITRIFIKASI
BIJI BENIH & PROTOKOM
*Phalaenopsis gigantea***

LOW WAN CHIN

**DISERTASI INI DIKEMUKAKAN UNTUK MEMENUHI SEBAHAGIAN
DARIPADA SYARAT MEMPEROLEHI IJAZAH SARJANA MUDA SAINS
DENGAN KEPUJIAN**

**PERPUSTAKAAN
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH**

**PROGRAM BIOTEKNOLOGI
SEKOLAH SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH**

MAY 2008



UMS
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

PENGAKUAN

Saya akui karya ini adalah hasil kerja saya sendiri kecuali nukilan dan ringkasan yang setiap satunya telah dijelaskan sumbernya.

8 May 2008



LOW WAN CHIN

HS 2005 - 6318



PENGESAHAN**Tandatangan****1. PENYELIA**

(Dr. Zaleha Abdul Aziz)




2. PEMERIKSA

(Dr. Jualang Azlan Gansau)



3. DEKAN

(SUPT/KS Prof. Madya Dr. Shariff A. Kadir S. Omang)



PENGHARGAAN

Terlebih dahulu saya ingin mengambil kesempatan ini untuk merakamkan setinggi-tinggi penghargaan kepada penyelia saya, Dr. Zaleha yang sudi memberikan saya peluang untuk membuat projek ini dan juga segala tunjuk ajar dan nasihat yang telah banyak memantapkan saya daripada pelbagai segi dalam menyempurnakan disertasi ini.

Selain itu, saya juga ingin merakamkan ucapan terima kasih kepada pembantu makmal Bioteknologi, Encik Musbah, Cik Radizah dan Cik Christina yang telah membantu dari segi material. Ucapan terima kasih turut diberikan kepada pembantu makmal Biologi pemuliharaan, Cik Dorrien yang telah membantu dari segi mikroskop dan Kak Ruth yang membantu dari segi maklumat dan pengalaman.

Di samping itu, ribuan terima kasih diucapkan kepada Cik Maryani, Cik Jenetta, Cik Cyrlyne, Encik Dieny dan Encik Makdi yang sudi bertoleransi, bekerjasama dan berkongsi alatan makmal.

Akhir sekali, ucapan terima kasih juga ditujukan kepada keluarga saya yang tersayang atas sokongan dan dorongan yang telah memberikan semangat kepada saya untuk menjayakan projek ini.



ABSTRAK

Phalaenopsis gigantea merupakan orkid yang dikelaskan sebagai spesis yang terancam dalam *Appendix II of the Convention on International Trade in Endangered Species* (CITES). Oleh sebab itu, spesis perlu dilindungi dan dipelihara daripada kepupusan. Pengawetan krio merupakan salah satu cara yang berkesan untuk memulihara bahan tumbuhan dalam penyimpanan jangka masa yang panjang. Dalam kajian ini, kaedah vitrifikasi digunakan untuk mengawet-krio biji benih dan protokom spesis ini. Protokol pengawetan krio kajian ini merangkumi pra-pertumbuhan, pra-kultur, rawatan pemuatan, rawatan dehidrasi dengan larutan vitrifikasi, penyimpanan dalam cecair nitrogen, penyahbekuan, rawatan penurunan, rawatan pencucian dan seterusnya percambahan semula. Kesan masa pra-pertumbuhan yang berbeza (0 hari – 10 hari) dan pengaruh media pra-kultur dengan kepekatan sukrosa yang berlainan (0M - 0.6M) terhadap viabiliti biji benih telah dinilai. Kesan media percambahan yang ditambah dengan *surfactant* pada kepekatan yang berbeza terhadap percambahan semula biji benih setelah penyimpanan dalam cecair nitrogen telah dikaji. Selain itu, pengaruh masa prakultur yang berbeza dikaji terhadap viabiliti biji benih dan protokom. Kajian masa rawatan pemuatan yang berbeza turut dijalankan pada protokom. Ujian viabiliti ditentukan dengan dua kaedah, iaitu analisis TTC dan ujian percambahan semula. Media prakultur dengan 0.3M sukrosa memberi nilai percambahan yang paling tinggi iaitu $8.3\% \pm 2.3\%$ manakala media percambahan yang mengandungi *surfactant* menunjukkan percambahan yang paling tinggi dengan $6.3\% \pm 5.5\%$ pada kepekatan 0.5% (w/v). Kesan masa pra-pertumbuhan dan prakultur gagal dinilai. Hasil pertumbuhan biji benih yang diawet-krio terdiri daripada protokom, protokom baru dan kalus. Selain itu, protokom yang diawet-krio tidak menunjukkan kehidupan semasa pertumbuhan semula.



ABSTRACT

Phalaenopsis gigantea is classified as an endangered species in the Appendix II of the Convention on International Trade in Endangered Species (CITES), and thus, this species needs to be protected in order to avoid extinction. Cryopreservation is one of the practicable approach that can conserve the plant material for long term storage. In this study, vitrification was used to cryopreserve the seeds and protocorm of this orkid species. Vitrification-based cryopreservation protocol involves the pre-growth, pre-culture, loading treatment, dehydration by vitrification solution, storage in liquid nitrogen, thawing, unloading treatment, washing process, and re-growth. The effect of different pre-growth periods (0 day – 10 days) and different sucrose concentrations of pre-culture media (0M – 0.6M) on the seed viability was evaluated. The effect of different concentration of surfactant in the germination medium for post-thaw recovery was studied. In addition, the effect of different pre-culture periods to the viabilities of seed and protocorm were examined. Study on the effect of different incubation periods of loading solution was also conducted on the viability of protocorm. Viability test was conducted using two ways; TTC assay and re-growth analysis. Pre-culture medium with 0.3M sucrose gave the best germination percentage which was $8.3\% \pm 2.3\%$ and germination medium containing 0.5% (w/v) surfactant showed the highest germination percentage of $6.3\% \pm 5.5\%$. The effect of different periods of pre-growth and pre-culture failed to be determined. The cryopreserved seeds germinated into protocorms and callus. Cryopreserved protocorms did not survived after storage in liquid nitrogen.



KANDUNGAN

Muka Surat

PENGAKUAN	ii
PENGESAHAN	iii
PENGHARGAAN	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
KANDUNGAN	vii
SENARAI JADUAL	x
SENARAI RAJAH	xi
SENARAI FOTO	xii
SENARAI SIMBOL	xiii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
BAB 2 ULASAN PERPUSTAKAAN	4
2.1 Orchidaceae	4
2.1.1 <i>Phalaenopsis</i>	6
2.1.2 <i>Phalaenopsis gigantea</i>	7
2.2 Biji Benih	8
2.2.1 Biji Benih <i>Phalaenopsis gigantea</i>	9
2.2.2 Peringkat Pertumbuhan Biji Benih	9
2.3 Pemuliharaan	10
2.3.1 Pemuliharaan <i>in situ</i>	11
2.3.2 Pemuliharaan <i>ex situ</i>	12
2.4 Pengawetan Krio	13
2.5 Vitrifikasi	15



2.5.1	Prakultur	16
2.5.2	Pemuatan, Dehidrasi dan Pembekuan	18
2.5.3	Penyahbekuan, Penurunan dan Pencucian	19
2.6	Pemulihan	20
2.7	Ujian Viabiliti	21
BAB 3	BAHAN DAN KAEDAH	23
3.1	Pengambilan Sampel	23
3.2	Penyediaan Larutan dan Media	23
3.2.1	Larutan Pensterilan	23
3.2.2	Larutan Stok Makronutrien NDM (100X)	24
3.2.3	Larutan Stok Mikronutrien NDM (100X)	25
3.2.4	Larutan Stok Organik NDM (100X)	26
3.2.5	Larutan Stok Fe-EDTA NDM (100X)	27
3.2.6	Media Percambahan	27
3.2.7	Media Pra-kultur	28
3.2.8	Larutan Pemuatan (<i>Loading solution</i>)	29
3.2.9	Larutan Vitrifikasi	30
3.2.10	Larutan Penurunan (<i>unloading solution</i>)	31
3.2.11	Larutan Pencucian (<i>Washing solution</i>)	31
3.2.12	Larutan Pluronik F 68	32
3.2.13	Larutan TTC	33
3.3	Pensterilan	34
3.4	Rawatan Pra-Pertumbuhan dan Prakultur	35
3.5	Pemuatan, Dehidrasi dan Pembekuan	37
3.6	Penyahbekuan, Rawatan Penurunan, Pencucian dan Pemulihan	38



3.7	Ujian Viabiliti	39
3.7.1	Analisis TTC	39
3.7.2	Ujian Percambahan Semula	40
BAB 4	KEPUTUSAN	41
4.1	Ujian Viabiliti bagi Kapsul Pertama	41
4.1.1	Analisis TTC	41
4.1.2	Ujian Percambahan Semula	43
4.2	Ujian Viabiliti untuk Kapsul Kedua	49
4.3	Ujian Viabiliti untuk Protokom	54
BAB 5	PERBINCANGAN	57
5.1	Ujian Viabiliti TTC dan Ujian Percambahan Semula	57
5.2	Kesan Penambahan Pluronik F 68 dalam Media Percambahan	59
5.3	Faktor-faktor Halangan Percambahan	59
5.4	Kesan Pengaruh Rawatan Prakultur	60
5.5	Kesesuaian Protokom terhadap Vitrifikasi	62
BAB 6	KESIMPULAN	63
	RUJUKAN	65



SENARAI JADUAL

No. Jadual	Muka Surat
2.1 Nama saintifik dan nama biasa orkid – orkid	5
2.2 Peringkat pertumbuhan biji benih orkid	10
3.1 Komposisi larutan stok makronutrien NDM	24
3.2 Komposisi larutan stok mikronutrien NDM	25
3.3 Komposisi larutan stok organik NDM	26
3.4 Komposisi larutan stok Fe-EDTA NDM	27
3.5 Jisim sukrosa yang diperlukan untuk kepekatan yang berlainan	29
3.6 Jisim sukrosa yang diperlukan untuk larutan pencucian yang berlainan	32
3.7 Jumlah isipadu larutan stok Pluronik F 68 yang diperlukan	33
3.8 Komposisi 0.05M larutan penimbal fosfat pH 7.4	34
4.1 Pengaruh kepekatan sukrosa terhadap pertumbuhan biji benih pada minggu ke-30 selepas pengawetan krio	44
4.2 Pengaruh kepekatan Pluronik F 68 terhadap pertumbuhan biji benih pada minggu ke-30 selepas pengawetan krio	45



SENARAI RAJAH

No. Rajah	Muka Surat
2.1 Peringkat-peringkat pertumbuhan biji benih orkid	10
4.1 Pengaruh kepekatan sukrosa terhadap pembentukan formazan sebelum dan selepas penyimpanan dalam cecair nitrogen	42
4.2 Pengaruh kepekatan sukrosa terhadap pembentukan formazan sebelum dan selepas penyimpanan dalam cecair nitrogen	42
4.3 Perkembangan pertumbuhan biji benih daripada minggu ke-5 sehingga minggu ke-30 berdasarkan kepekatan sukrosa masing-masing	46
4.4 Pengaruh keadaan rawatan prakultur terhadap pembentukan formazan sebelum dan selepas penyimpanan dalam cecair nitrogen	50
4.5 Pengaruh keadaan rawatan prakultur terhadap pembentukan formazan sebelum dan selepas penyimpanan dalam cecair nitrogen	51
4.6 Pengaruh masa inkubasi larutan loading terhadap pembentukan formazan sebelum dan selepas penyimpanan dalam cecair nitrogen	54
4.7 Pengaruh tempoh masa prakultur terhadap pembentukan formazan sebelum dan selepas penyimpanan dalam cecair nitrogen	55



SENARAI FOTO

No. Foto	Muka Surat
2.1 Daun <i>Phalaenopsis gigantea</i> yang besar	7
2.2 Bunga <i>Phalaenopsis gigantea</i>	8
4.1 Pertumbuhan biji benih <i>Phalaenopsis gigantea</i> dalam rawatan kawalan (tanpa pengawetan krio)	47
4.2 Jenis- jenis pertumbuhan biji benih <i>Phalaenopsis gigantea</i> yang diperhatikan selama 30 minggu selepas pencairan	48
4.3 Pertumbuhan biji benih <i>Phalaenopsis gigantea</i> kapsul kedua dalam rawatan kawalan (tanpa pengawetan krio)	52
4.4 Tahap kemerahan formazan yang terbentuk daripada ujian TTC	53
4.5 Protokom <i>Phalaenopsis gigantea</i> pada peringkat yang berbeza	56



SENARAI SIMBOL

M	Molariti
%	Peratusan
(w/v)	jisim per isipadu
(v/v)	isipadu per isipadu
ml	mililiter
g	gram
mg	miligram
p.s.i	<i>pound per square inch</i>
°C	darjah Celsius
µm	mikrometer



BAB 1

PENDAHULUAN

Orchidaceae merupakan famili yang terbesar dalam tumbuhan berbunga – Angiospermae. Di bawah Enakmen Pemuliharaan Hidup Liar 1997, anggerik atau orkid hutan dilindungi dari buruan dan tuaian terhad berlesen. *Phalaenopsis gigantea* merupakan orkid liar yang hanya boleh didapati di Borneo sahaja. Ia telah dikelaskan sebagai spesis yang terancam dalam *Appendix II of the Convention on International Trade in Endangered Species* (CITES). Oleh sebab itu, pemuliharaan yang rapi diperlukan supaya spesis ini tidak pupus pada masa depan.

Pemuliharaan terbahagi kepada pemuliharaan *in situ* dan pemuliharaan *ex situ*. Pemuliharaan *in situ* lebih sukar dijalankan berbanding dengan pemuliharaan *ex situ* kerana memerlukan masa yang panjang dan tenaga kerja yang berpengalaman (Hintum *et al.*, 2007). Oleh sebab itu, pemuliharaan *ex situ* telah bertindak sebagai cara alternatif untuk memelihara spesis-spesis yang hampir atau mempunyai potensi untuk pupus pada masa depan.



BAB 2

ULASAN PERPUSTAKAAN

2.1 Orchidaceae

Famili orkid, Orchidaceae merupakan famili yang paling besar dalam alam tumbuh-tumbuhan dengan lebih kurang 800 genera dan tersebar di seluruh dunia. Orkid terdiri daripada satu per tiga daripada semua monocots, iaitu lebih kurang 20, 000 spesis. Genera yang lebih penting secara komersil terdiri daripada *Cattleya*, *Cymbidium*, *Dendrobium*, *Odontoglossum*, *Oncidium*, *Paphiopedilium* dan *Phalaenopsis* (Rasmussen, 1995).



Pengawetan krio yang didefinisikan sebagai penyimpanan jangka masa panjang dalam suhu terlampau rendah merupakan salah satu pemuliharaan *ex situ* yang amat berkesan (Bajaj, 1995). Hal ini kerana pengawetan krio berupaya menjaga kestabilan genetik pada masa yang sama memelihara spesis yang hampir pupus. Kaedah-kaedah pengawetan krio adalah seperti pembekuan kadar lambat, enkapsul-dehidrasi, vitrifikasi, enkapsul-vitrifikasi dan pembekuan titisan. Spesis yang berbeza memerlukan protokol pengawetan krio yang berlainan supaya pemuliharaan dapat dijalankan dengan berkesan.

Vitrifikasi merangkumi proses-proses pemuatan, dehidrasi, pembekuan dan pencairan (Engelmann, 1997). Setiap langkah yang terlibat membawa pengaruh yang besar untuk menentukan kejayaan pengawetan krio. Oleh sebab itu, bahan dan kaedah yang digunakan mesti berkesan kepada spesis sampel yang dikaji. Pemulihan selepas pencairan amat penting untuk menentukan viabiliti biji benih yang telah diawet-krio. Viabiliti biji benih turut boleh dikesan dengan ujian-ujian kimia seperti ujian pengurangan TTC (*2,3,5-Triphenyl-2H-tetrazolium chloride*).

Sebelum pengawetan krio atau vitrifikasi dapat dilaksanakan, rawatan pra-pertumbuhan pada media percambahan dan rawatan prakultur perlu dijalankan ke atas biji benih. Hal ini adalah untuk menyediakan biji benih terdedah kepada keadaan yang bersuhu terlampau rendah. Larutan pemuatan turut memainkan peranan yang penting dalam mengurangkan kesan negatif yang dibawa oleh larutan vitrifikasi kepada sel-sel. Selepas pengawetan krio, penambahan bahan aktif-permukaan (*surfactant*) atau hormon dapat mengalakkan pertumbuhan semula.



Jadual 2.1 Nama saintifik dan nama biasa orkid – orkid.

Nama saintifik	Nama biasa
<i>Cattleya</i>	Orkid cattleya
<i>Cymbidium</i>	Orkid cymbidium
<i>Dendrobium</i>	Orkid dendrobium
<i>Odontoglossum</i>	Orkid <i>tooth-tongue</i>
<i>Oncidium</i>	Orkid <i>dancing lady</i>
<i>Paphiopedilum</i>	Orkid selipar atau <i>lady's slipper</i>
<i>Phalaenopsis</i>	Orkid rama-rama

Orkid biasanya digunakan sebagai bunga potong untuk dipakai oleh wanita dan aturan floral. Ia juga digunakan sebagai tumbuhan bunga berpasu dan sebagai tumbuhan alas bagi kawasan tropical (Griesbach, 2002).

Penghasilan orkid adalah mahal kerana masa yang panjang diperlukan untuk memperoleh satu tumbuhan orkid memerlukan masa beberapa tahun. Tambahan pula, jika orkid tersebut akan dijadikan bunga potong, orkid yang mempunyai jangka masa panjang akan ditumbuhkan bertahun-tahun. Biasanya, pembungaan akan berlaku mengikut musim dan tahunan. Oleh sebab itu, bunga dalam kuantiti yang banyak akan dihasilkan pada masa yang sama, dan akan menurunkan harga pasaran. Dengan adanya penyimpanan orkid yang diingini, pembungaan dapat dilakukan bila-bila masa.

2.1.1 *Phalaenopsis*

Phalaenopsis boleh didapati di Asia Tenggara dari Gunung Himalaya ke pulau-pulau Polillo dan Palawan (Filipina) dan bahagian utara Australia. Genus ini merangkumi lebih kurang 60 spesis family Orchidaceae. Kebanyakan *Phalaenopsis* adalah epifitik dan sebahagian kecil adalah lithofitik. Ini bermaksud kebanyakan orkid jenis ini memerlukan tumbuhan lain sebagai sokongan untuk pertumbuhan. Orkid hutan *Phalaenopsis* biasanya boleh didapati di bahagian bawah hutan tanah rendah yang lembap dan dilindungi daripada cahaya matahari (Wood & Gribb, 1994).

Orkid *Phalaenopsis* digunakan sebagai bunga tumbuhan berpasu dan bunga potongan dalam kerja reka bentuk, terutamanya dalam perkahwinan bagi bunga *Phalaenopsis* yang berwarna putih tulen. Di antara semua orkid, orkid dalam genus ini yang lebih senang dipelihara di rumah dan akan berbunga setiap tahun jika terdapat jagaan yang rapi. Hybrid *Phalaenopsis* dengan *Doritis pulcherrima* menghasilkan kultivar yang amat cantik dan nilai komersil yang tinggi melalui hibridisasi intergenetik (Shrestha *et al.*, 2007). *Phalaenopsis* juga merupakan salah satu orkid yang dihasilkan secara besar-besaran sebagai bunga tumbuhan berpasu di seluruh dunia. Negara-negara yang terlibat adalah seperti Belanda, German, China, Taiwan, Amerika Syarikat, dan Jepun (Griesbach, 2002).

Spesis *Phalaenopsis* sukar untuk membiak secara vegetatif kerana ia adalah orkid monopodial yang tidak dapat membiak dengan kultur tunas susur (Duan *et al.*, 1996). Kultur daun, tangkai bunga dan hujung pucuk telah dikaji. Akan tetapi, masalah seperti pengambilan masa yang panjang dan kadar pembiakan yang rendah

tidak dapat dielakkan. Oleh sebab itu, ia adalah lebih senang bertumbuh dalam kuantiti yang banyak dengan pertumbuhan secara langsung daripada biji benih. Maka, pengawetan-krio biji benih *P.gigantea* diselidikkkan.

2.1.2 *Phalaenopsis gigantea*

Phalaenopsis gigantea, dikenali sebagai orkid telinga gajah atas sebab daunnya yang besar seperti yang ditunjukkan dalam Foto 2.1. Orkid ini diperkenalkan oleh Johannes Jacobus Smith (1867 – 1947), yang merupakan seorang ahli botani berbangsa Belanda yang unggul dan Pengarah bagi Herbarium Bogoriense di Jawa, Indonesia. (Wood & Gribb, 1994).



Foto 2.1 Daun *Phalaenopsis gigantea* yang besar.

Phalaenopsis gigantea biasanya didapati di tanah rendah dan bukit yang terdapat di hutan dipterocarp (pokok yang tergolong dalam famili Dipterocarpaceae). Lingkungan ketinggian altitude adalah 600 meter paras laut. Orkid ini bersifat endemik dan boleh didapati di Borneo sahaja iaitu Sabah (Malaysia) dan Kalimantan (Indonesia) (Wood & Gribb, 1994).

Phalaenopsis gigantea terkenal dengan bunga yang cantik dan menyerupai gegat serta kacukannya turut memenangi banyak anugerah dalam persidangan orkid peringkat antarabangsa. Foto 2.2 menunjukkan bunga *P.gigantea* yang cantik. Orkid ini telah dikelaskan sebagai spesis yang terancam dalam Appendix II of the Convention on International Trade in Endangered Species (CITES). Oleh sebab itu, orkid ini perlu dipelihara dengan rapi.



Foto 2.2 Bunga *Phalaenopsis gigantea*.

2.2 Biji Benih

Biji benih tumbuh-tumbuhan biasanya dibahagi kepada tiga jenis berdasarkan kepekaan kepada kekeringan dan sifat penyimpanan. Tiga jenis biji benih ini adalah biji benih ortodoks, biji benih yang sensitif kepada kekeringan dan biji benih yang di antara dua jenis yang disebut di atas (Sun, 1999).

Biji benih ortodoks berupaya hidup dalam keadaan kering yang melampau untuk penyimpanan jangka masa panjang. Jangka hayat biji benih ortodoks meningkat apabila kandungan air dalam biji benih menurun kepada satu tahap yang amat rendah. Ia biasanya disimpan dalam keadaan kering.

Biji benih jenis kedua merupakan biji benih yang sensitif kepada kekeringan. Ia biasanya mengandungi kandungan air yang tinggi dan mesti dipelihara di atas satu tahap air yang kritikal untuk mengekalkan viabiliti. Oleh sebab kandungan air yang tinggi dan keadaan metabolik yang aktif, biji benih jenis ini biasanya akan kehilangan viabiliti dengan cepat di bawah keadaan penyimpanan yang biasa. Biji benih jenis ini juga sensitif kepada suhu. Oleh sebab itu, penyimpanan jangka masa panjang di dalam bank germplasma bagi jenis biji benih ini bergantung kepada pengawetan-krio.

2.2.1 Biji Benih *Phalaenopsis gigantea*

Saiz biji benih *Phalaenopsis* adalah lebih kurang 0.41×0.10 mm dan warnanya adalah perang atau lingkungan putih kepada krim (Arditti, 1967). Biji benih orkid ini adalah sangat kecil dan tidak mempunyai endosperm. Oleh itu, ia mempunyai amat sedikit penyimpanan makanan atau tanpa penyimpanan makanan. Satu kapsul mungkin mengandungi 1,500 sehingga 3,000,000 biji benih. Tempoh masa pematangan bagi *Phalaenopsis* ialah lebih kurang 6 bulan.

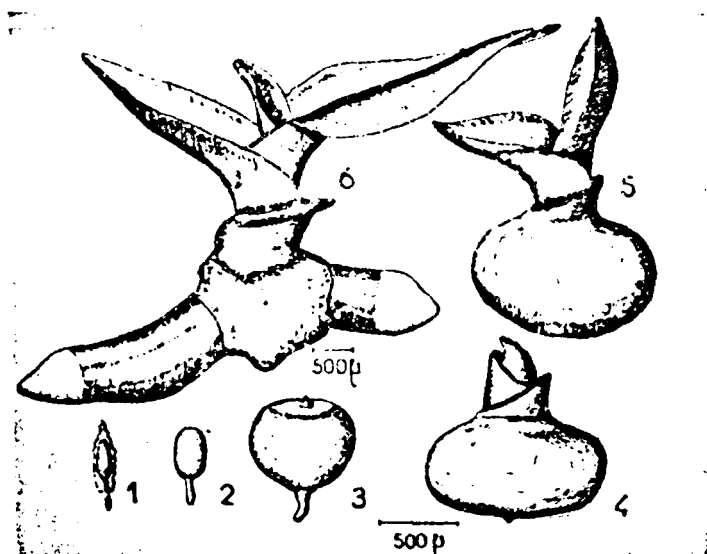
2.2.2 Peringkat Pertumbuhan Biji Benih

Terdapat enam peringkat untuk mengenalpasti pertumbuhan biji benih orkid. Jadual 2.2 (Kauth *et al.*, 2006; Stewart and Kane, 2006) dan Rajah 2.1 (Arditti, 1967) menunjukkan perbezaan antara peringkat-peringkat ini.



Jadual 2.2 Peringkat- peringkat pertumbuhan biji benih orkid (Kauth *et al.*, 2006; Stewart and Kane, 2006)

Peringkat 1	<i>Imbibed seed</i> , embrio membengkak dan hijau tetapi masih dalam testa.
Peringkat 2	Embrio terus membengkak, kulit biji benih pecah dan tertanggal.
Peringkat 3	Pembentukan protokom dengan satu bucu yang runcing.
Peringkat 4	Protokom dengan pembentukan daun pertama.
Peringkat 5	Anak benih dengan satu atau lebih daun.
Peringkat 6	Anak benih dengan dua atau lebih daun dan mempunyai akar.



Rajah 2.1 Peringkat-peringkat pertumbuhan biji benih orkid. 1= Peringkat 1, 2= Peringkat 2, 3= Peringkat 3, 4= Peringkat 4, 5= Peringkat 5 dan 6= Peringkat 6 (Arditti, 1967).

2.3 Pemuliharaan

Pemuliharaan ialah proses yang giat mengekalkan dan menguruskan diversiti dengan tujuan memelihara kelompok gen sebenar atau yang mempunyai potensi dalam penggunaan. Pemuliharaan diversiti tumbuh-tumbuhan adalah amat penting kerana terdapatnya berbagai-bagai manfaat terhadap manusia. Dengan adanya eksploitasi

didapati daripada koleksi yang diletakkan dalam bank gen lain. Pemindahan sampel melibatkan kos yang tidak tinggi jika berbanding dengan pemuliharaan *in situ*. Jika sampel hilang di satu ladang, kuantiti sumber yang besar perlu dibelanjakan dan penubuhan projek itu akan telah disia-siakan. Tambah-tambah lagi, kos dan masa untuk memulihkan populasi perlu dipertimbangkan.

Akan tetapi, pemuliharaan *in situ* dapat mengekalkan evolusi yang menyebabkan pembangunan genetik kepelbagaian di satu tapak tertentu, dan juga akan menjurus modifikasi diversiti yang lanjut pada masa depan.

2.3.2 Pemuliharaan *ex situ*

Pemuliharaan *ex situ* bermaksud satu proses melindungi spesis yang hampir pupus dengan mengambil sebahagian daripada populasi spesis tersebut dan membiak dalam lokasi yang baru, di mana kawasan liar atau kawasan di bawah jagaan manusia. Pemuliharaan *ex situ* merupakan kaedah alternatif bagi pemuliharaan apabila pemuliharaan *in situ* tidak dapat dijalankan. Pemuliharaan *ex situ* sumber genetik tumbuhan dalam bank-bank gen melibatkan pemilihan sampel yang akan disimpan dan penyenggaraan sampel ini untuk penggunaan sekarang dan masa depan (Hintum *et al.*, 2007).

Unsur pertama yang perlu dipertimbangkan ialah pemilihan sampel. Kaedah yang biasa digunakan untuk memelihara sumber genetik tumbuhan bergantung pada biji benih (Engelmann, 1997). Kepentingan kedua pemuliharaan *ex situ* adalah memastikan sumber yang dipelihara sedia ada. Sebagai contohnya, apabila



terhadap perkembangan pertanian dan pekebunan, ubat-ubatan baru dan hasil lain dapat diperkembang. Akan tetapi, diversiti genetik tumbuh-tumbuhan semakin hari semakin hilang, dan proses ini kemungkinan akan berlaku pada kadar yang lebih tinggi pada masa depan (Maxted *et al.*, 2002).

2.3.1 Pemuliharaan *in situ*

Pemuliharaan *in situ* bermaksud pemuliharaan ekosistem dan habitat semula jadi serta penyenggaraan dan pemulihan populasi spesies yang berkeupayaan hidup dalam suasana semula jadi dan, dalam kes *domesticates* atau spesies tanaman, dalam persekitaran di mana spesis tersebut telah berkembang ciri-ciri tersendiri (Maxted *et al.*, 2002). Dengan itu, pemuliharaan *in situ* merangkumi dua konsep atau teknik yang dikenali sebagai pemuliharaan simpanan genetik (*genetic reserve conservation*) dan pemuliharaan di-ladang (*on-farm conservation*).

Konsep pemuliharaan simpanan genetik adalah seperti pengurusan, lokasi dan pemantauan kepelbagaian genetik dalam populasi liar yang semula jadi di dalam kawasan ditakrifkan untuk pemuliharaan yang aktif dan jangka masa panjang. Pemuliharaan di-ladang pula merangkumi pengurusan berlanjutan perkembangan kepelbagaian genetik, kepelbagaian hasil dengan spesis liar oleh penternak-penternak di dalam pertanian tradisional, hortikultur atau agrisilvikultur.

Pemuliharaan *in situ* mengambil masa yang panjang dan kos yang lebih tinggi berbanding dengan pemuliharaan *ex situ*. Berbanding dengan pemuliharaan *ex situ*, jika koleksi asal hilang daripada satu bank gen, sampel koleksi serupa masih boleh

RUJUKAN

- Acker, J. P. & Croteau, I. M. 2004. Pre- and post-thaw assessment of intracellular ice formation. *Journal of Microscopy* **215**: 131–138.
- Anthony, P., Jelodar, N. B., Lowe, K. C., Power, J. B. & Davey, M. R. 1996. Pluronic F-68 increases the post-thaw growth of cryopreserved plant cells. *Cryobiology* **33**: 508-514.
- Arditti. 1967. *The Botanical Review: Interpreting Botanical Progress*. The New York Botanical Garden, New York.
- Bajaj, Y.P.S. 1985. Cryopreservation of plant cell cultures and its prospects in agricultural and forest biotechnology. In: Natesh S. *et al.* (ed) International Workshop Biotechnology in agricultural evolving a research agenda for the International Centre of Genetic Engineering and Biotechnology: 109-131.
- Bajaj, Y.P.S. 1995. Cryopreservation of plant cell, tissue and organ culture for the conservation of germplasm and biodiversity. *Biotechnology in Agriculture and Forestry* **32**: 3-28.
- Benson, E. E., Johnson, J., Muthusamy, J. & Harding, K. 2006. Physical and engineering perspective of in vitro plant cryopreservation. *Plant Tissue Culture Engineering*: 441-476.
- Bonga, J.M. & Aderkas, P.V. 1992. *Forestry Sciences: In Vitro Culture of Trees*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.
- Bukhov, N.G., Popova, E.V. & Popov, A.S. 2006. Photochemical activities of two photosystems in *Bratonia* Orchid protocorms cryopreserved by vitrification method. *Russian Journal of Plant Physiology* **53**: 793-799.



- Chang, W-C, Chen, M-H. & Lee, T-M. 1998. 2,3,5-Triphenyltetrazolium reduction in the viability assay of *Ulva fasciata* (Chlorophyta) in response to salinity stress. *Botanical Bulletin Academic Sin* **40**: 207-212.
- Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora. 2007. *Appendices I, II and III*. <http://www.cites.org/eng/app/appendices.pdf> (dilayari pada May 2007).
- Desai, B. B. 2004. *Seed Handbook: Biology, Production, Processing and Storage*. CRC Press. United States of America.
- Duan, J-X., Chen, H. & Yazawa, S. 1996. In vitro propagation of *Phalaenopsis* via culture of cytokinin-induced nodes. *Journal of Plant Growth Regulator* **15**: 133-137.
- Engelmann, F. 1997. In vitro conservation methods. *Biotechnology and Plant Genetic Resources: Conservation and Use*: 119-161.
- Ernst, Robert. 1994. Effects of thidiazuron on in vitro propagation of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* (Orchidaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **39**: 273-275.
- Faria, R. T., Rodrigues, F. N., Oliveira, L. de V.R. & Müller, C. 2004. In vitro *Dendrobium nobile* plant growth and rooting in different sucrose concentrations. *Horticultura Brasileira* **22**: 780-783.
- Giladi, I., Altman, A. & Goren, R. 1977. Differential effects of sucrose, abscisic acid, and benzyladenine on shoot growth and callus formation in the abscission zone of excised citrus buds. *Plant Physiol* **59**: 1161-1164.
- Goldner, E. M., Seitz, U. & Reinhard, E. 1991. Cryopreservation of *Digitalis lanata* cell cultures: Preculture and freeze tolerance. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **24**: 19-24.



- Griesbach, R. J. 2002. Development of *Phalaenopsis* orchids for the mass-market. *Trends in new crops and new uses*: 458-465.
- Halmagyi, A. & Deliu, C. 2007. Cryopreservation of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) shoot tips by encapsulation-vitrification. *Scientia Horticulturae* 113: 300-306.
- Hintum, T. J. L., Wiel, C. C. M., Visser, D. L., Treuren, R. & Vosman, B. 2007. The distribution of genetic diversity in a *Brassica oleracea* gene bank collection related to the effects on diversity of regeneration, as measured with AFLPs. *Theory of Applied Genetic* 114: 777-786.
- Ishikawa, K., Harata, K., Mii, M., Sakai, A., Yoshimatsu, K. & Shimomura, K. 1997. Cryopreservation of zygotic embryos of a Japanese terrestrial orchid (*Bletilla striata*) by vitrification. *Plant Cell Reports* 16: 754-757.
- Jabatan Hidupan Liar, 2003. *Bahagian 4: Enakmen-enakmen yang berkaitan dengan pemuliharaan di Sabah*. <http://www.sabah.gov.my/jhl/edu/ekosistem%20pergunungan/BAH.4.pdf> (dilayari pada May 2007).
- Joshi, A. & Teng, W. L. 2000. Cryopreservation of Panax ginseng cells. *Plant Cell Reports* 19: 971-977.
- Kauth, P. J., Vendrame, W. A. & Kane, M. E. 2006. In vitro seed culture and seedling development of *Calopogon tuberosus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 85: 91-102.
- Kartha, K.K. & Engelmann, F. 1994. Cryopreservation and germplasm storage. *Plant Cell and Tissue Culture*: 195-230.
- Kumar, V., Laouar, L., Davey, M. R., Mulligan, B. J. & Lowe, K. C. 1991. Effects of Pluronic F-68 on callus growth and protoplast plating efficiency of *Solanum dulcamara*. *Plant Cell Reports* 10: 52-54.



- Kumar, V., Laouar, L., Davey, M. R., Mulligan, B. J. & Lowe, K. C. 1992. Pluronic F-68 stimulates growth of *Solanum dulcamara* in culture. *Journal of Experimental Botany* 43: 487-493.
- Lambardi, M., Fabbri, A. & Caccavale, A. 1999. Cryopreservation of white poplar (*Populus alba* L.) by vitrification of in vitro-grown shoot tips. *Plant Cell Reports* 19: 213-218.
- Liu, T-H A., Lin, J-J. & Wu, R-Y. 2006. The effects of using trehalose as a carbon source on the proliferation of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* protocorm-like-bodies. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 86: 125-129.
- Matsumoto, T., Sakai, A. & Yamada, K. 1994. Cryopreservation of *in vitro* grown apical meristems of wasabi (*Wasabiajaponica*) by vitrification and subsequent high plant regeneration. *Plant Cell Reports* 13: 442-446.
- Maxted, N., Guarino, L., Myer, L. & Chiwona, E.A. 2002. Towards a methodology for on-farm conservation of plant genetic resources. *Genetic Resources and Crop Evolution* 49: 31-46.
- Mikuła, A., Niedzielski, M. & Rybczynski, J. J. 2006. The use of TTC reduction assay for assessment of *Gentiana* spp. cell suspension viability after cryopreservation. *Acta Physiologiae Plantarum* 28: 315-324.
- Murdad Rosmah, Kuik Sok Hwa, Choo Khen Seng, Abd. Latip Mariam, Abdul Aziz Zaleha & Ripin Rimi, 2006. High frequency multiplication of *Phalaenopsis gigantea* using trimmed bases protocorms technique. *Scientia Horticulturae* 111: 73-79.
- Mweetwa, A.M., Welbaum, G.E. & Tay, D. 2006. Orchid seed storage for germplasm preservation. *Acta Horticulturae*.



- Nanakorn, W. & Indharamusika, S. 1998. Ex-situ conservation of native Thai orchids at Queen Sirikit Botanic Garden. *Pure Applied Chemistry* **70**: 2115.
- Nikishina, T. V., Popova, E. V., Vakhrameeva, M. G., Varlygina, T. I., Kolomeitseva, G. L., Burov, A. V., Popovich, E. A., Shirokov, A. I., Shumilov, V. Yu. & Popov, A. S. 2007. Cryopreservation of seeds and protocorms of rare temperate orchids. *Russian Journal of Plant Physiology* **54**: 121-127.
- Pence, V.C. 1995. Cryopreservation of recalcitrant seed. *Biotechnology in Agriculture and Forestry* **32**: 29-50.
- Pennycooke, J. C. & Towill, L. E. 2000. Cryopreservation of shoot tips from in vitro plants of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] by vitrification. *Plant Cell Reports* **19**: 733-737.
- Popova, E. V., Nikishina, T. V., Kolomeitseva, G. L., & Popov, A. S. 2003. The effect of seed cryopreservation on the development of protocorms by the hybrid orchid *Bratonia*. *Russian Journal of Plant Physiology* **50**: 672-677.
- Rasmussen, F. N. 1995. Relationship of Burmanniales and Orchidales. *Monocotyledons: Systematic and Evolutions*: 227-241.
- Sakai, A., Kobayashi, S. & Oiyama, I. 1990. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Reports* **9**: 30-33.
- Sakai, A. 2000. Development of cryopreservation techniques. *Cryopresevation of Tropical Plant Germplasm, Current Progress and Application*: 1-7.
- Seitz, U., Banspach, D., Goldner, E. & Reinhard, E. 1990. Cryopreservation of plant cell cultures: The important of pretreatment. *The Impact of Biotechnology in Agriculture*: 449-458.



- Shrestha, B.R., Tokuhara, K. & Mii, M. 2007. Plant regeneration from cell suspension-derived protoplasts of *Phalaenopsis*. *Plant cell report* **26**: 719-715.
- Steponkus, P. L. & Lanphear, F. 1967. Refinement of the triphenyl tetrazolium chloride method of determining cold injury. *Plant Physiol* **42**: 1423-1426.
- Stewart, S. L. & Kane, M. E. 2006. Symbiotic seed germination of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid. *Plant Cell Tissue Organ Culture* **86**: 159–167.
- Sun, W. Q. 1999. State and phase transition behaviors of *Quercus rubra* seed axes and cotyledonary tissues: Relevance to the desiccation sensitivity and cryopreservation of recalcitrant seeds. *Cryobiology* **38**: 372–385.
- Takagi, H., Thinh, N. T., Islam, O. M., Senboku, T. & Sakai, A. 1997. Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of taro (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) by vitrification: Investigation of basic conditions of the vitrification procedure. *Plant Cell Reports* **16**: 594–599.
- Tokuhara, K. & Mii, M. 1993. Micropropagation of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* by culturing shoot tips of flower stalk buds. *Plant Cell Reports* **13**: 7 – 11.
- Tsukazaki, H., Mii, M., Tokuhara, K. & Ishikawa, K. 2000. Cryopreservation of *Doritaenopsis* suspension culture by vitrification. *Plant Cell Reports* **19**: 1160–1164.
- Verleysen, H., Samyn, G., Bockstaele, E. V. & Debergh, P. 2004. Evaluation of analytical techniques to predict viability after cryopreservation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **77**: 11–21.
- Veronica, M. A., Alfredo, G. F. & Valter F. N. 2006. Seed disinfestation methods for *in vitro* cultivation of epiphyte orchids from Southern Brazil. *Horticultura Brasileira* **24**: 217-220.



- Wang, Q., Özgür, B., Ping, L., Moshe, B. & Ron, G. 2002. A simple and efficient cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of 'Troyer' citrange [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. × *Citrus sinensis* (L.) Osbeck.] by encapsulation-vitrification. *Euphytica* **128**: 135–142.
- Wood, J.J. & Gribb, P.J, 1994. *A checklist of Orchid of Borneo*, Royal Botanic Gardens Kew, Great Britain.

