

**MIKROPROPAGASI ORKID *PAPHIOPEDILUM*
ROTHSCHILDIANUM MELALUI KULTUR
KALUS DAN CECAIR**

MAKDI MASNODDIN

**PERPUSTAKAAN
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH**

**TESIS INI DIKEMUKAKAN UNTUK MEMENUHI
SYARAT MEMPEROLEHI IJAZAH SARJANA SAINS**

**SEKOLAH SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH
2012**



UMS
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

ABSTRAK

MIKROPROPAGASI ORKID *PAPHIOPEDILUM ROTHSCILDIANUM* MELALUI KULTUR KALUS DAN CECAIR

Paphiopedilum rothschildianum merupakan spesies orkid selipar yang sangat jarang ditemui di habitat liar dan disenaraikan dalam appendix I *Convention on International Trade in Endangered Species* (CITES). Salah satu faktor yang menyumbang kepada penurunan jumlah populasi spesies ini ialah kadar pertumbuhannya yang perlahan. Dalam kajian ini, kaedah propagasi secara *in vitro* (mikropropagasi) digunakan untuk mempropagasi orkid tersebut kerana ia berpotensi menghasilkan tumbuhan baru dalam jumlah yang banyak dalam masa yang singkat. Objektif kajian ini adalah untuk membangunkan satu protokol untuk mikropropagasi *P. rothschildianum* menggunakan kalus sebagai eksplan dalam sistem kultur separa pepejal dan kultur cecair. Kajian ini terdiri daripada dua peringkat; peringkat pertama ialah untuk mengoptimumkan pengaruh dan penyelenggaraan kalus serta regenerasi JSP/pucuk daripada kalus pada media separa pepejal, peringkat kedua ialah pengaplikasian keadaan yang telah dioptimumkan (peringkat 1) dalam sistem kultur cecair [rendaman berterusan (kelalang) dan separa (RITA®)] untuk proliferasi kalus dan regenerasi JSP/pucuk. Dalam kajian pengaruh kalus, media asas ($\frac{1}{2}$ MS, $\frac{1}{4}$ MS dan RE); eksplan [(biji benih (BB), protokom teraruh dari biji benih (PTB), protokom sekunder (PS) dan segmen daun (SD)]; umur PTB (1, 2 dan 3 bulan); kepekatan TDZ (0-1 mg/l) dan 2,4-D (0-5 mg/l); kepekatan zeatin (0-5 mg/l); aditif (pepton, ekstrak yis, dan air kelapa); dan kepekatan sukrosa (20-50 g/l) yang berlainan dikaji. Penyelenggaraan kalus dilakukan dengan menguji kepekatan aditif (arang teraktif, pepton, ekstrak yis, dan air kelapa) dan sukrosa (20-50 g/l) yang berlainan. Pengaruh JSP/pucuk daripada kalus dilakukan dengan menilai kepekatan (0-5 mg/l) dan jenis (2,4-D, NAA, BAP, TDZ, Kinetin) pengawalatur tumbuhan yang berlainan. Kajian regenerasi JSP/pucuk diteruskan dengan menilai kesan sumber kalus (kalus yang diaruhkan daripada media dengan 0, 3 atau 5 mg/l 2,4-D), jenis (sukrosa, fruktosa dan glukosa) dan kepekatan (0, 2.7, 5 and 20 g/l) sumber karbon yang berlainan. Kalus (0.1 g) yang diaruhkan pada media separa pepejal dipindahkan pada media cecair (5 ml) dalam kelalang kon (50 ml) digoncangkan pada 100 rpm untuk memulakan kultur sel ampaian yang bertujuan untuk memproliferasi kalus. Penilaian sistem RITA® (5 min setiap 125 min masa rendaman) dilakukan dengan mengkulturkan kalus (0.5 g) dalam media cecair (150 ml). Kajian regenerasi JSP/pucuk dalam sistem RITA® diteruskan dengan menilai kesan jenis (sukrosa dan glukosa) dan kepekatan (2.7, 5 and 20 g/l) sumber karbon yang berlainan. Hasil kajian menunjukkan pengaruh kalus adalah lebih baik pada media asas $\frac{1}{2}$ MS ($80.0\% \pm 20.9$) berbanding $\frac{1}{4}$ MS ($65.0\% \pm 10.0$) and RE ($35.0\% \pm 28.5$). Pengaruh kalus juga lebih baik pada media $\frac{1}{2}$ MS berbanding media RE walaupun dengan kepekatan TDZ dan 2,4-D yang berlainan. Eksplan BB, PTB dan PS menghasilkan kalus seawal 30 hari pada kesemua rawatan di mana pengaruh dan proliferasi kalus paling baik pada media dengan 1 mg/l TDZ dan 5 mg/l 2,4-D dengan peratusan eksplan menghasilkan kalus masing-masing adalah $77.0\% \pm 4.5$, $95.0\% \pm 10.5$, dan $75.0\% \pm 20.4$ selepas 90 hari pengkulturan. PTB merupakan eksplan terbaik manakala PTB pada umur 3 bulan adalah paling sesuai untuk pengaruh kalus. Penambahan ekstrak yis dan zeatin meningkatkan kadar

pengaruh kalus ($85.0\% \pm 19.1$, $90.0\% \pm 11.5$) dan mengurangkan kadar kematian eksplan ($30.0\% \pm 11.5$, $25.0\% \pm 10.0$), manakala air kelapa dan kepekatan sukrosa melebihi 20 g/l mempunyai kesan yang sebaliknya dalam pengaruh dan proliferasi kalus. Penambahan 1-2 g/l arang teraktif telah meningkatkan kadar proliferasi kalus ($96.7\% \pm 10.5$) dan mengurangkan kadar keperangan kalus ($45.2\% \pm 25.3$) berbanding aditif lain. Kalus diselenggarakan pada media dengan 1 g/l arang teraktif selama lebih setahun. Regenerasi JSP daripada kalus diperolehi pada media dengan 0.5 TDZ dan 3 mg/l BAP, tetapi dengan kadar yang sangat rendah ($15.0\% \pm 13.7$ kalus menghasilkan purata 3 JSP). Kadar regenerasi JSP/pucuk meningkat ($37.5\% \pm 13.7$ kalus menghasilkan purata 5.9 JSP/pucuk) apabila kepekatan sukrosa dikurangkan (5 g/l) dan dengan penggunaan kalus yang teraruh daripada media dengan 1 mg/l TDZ. Pengubahsuaian jenis dan kepekatan sumber karbon kepada 2.7 g/l glukosa meningkatkan lagi kadar regenerasi ($67.5\% \pm 12.1$ kalus menghasilkan purata 4.1 JSP/pucuk). Peningkatan berat bersih kalus sebanyak $0.06g \pm 0.03$ direkodkan pada kultur kelalang, tetapi kadar keperangan dan *hyperhydricity* adalah tinggi. Proliferasi kalus menggunakan sistem RITA® menunjukkan 3 kali ganda peningkatan berat bersih kalus selepas 30 hari pengkulturan. Kalus yang teraruh daripada media dengan 1 mg/l TDZ menghasilkan 135 JSP/pucuk per gram kalus dalam sistem RITA® selepas 30 hari pengkulturan. Regenerasi JSP/pucuk meningkat (190 JSP/pucuk per gram kalus) dengan peningkatan kepekatan sukrosa dalam media daripada 5 g/l kepada 20 g/l.