PEMILIHAN DAN PEMBIAKAN ASPARAGUS (*Asparagus Officinalis* L.) VAR. MARY WASHINGTON MELALUI KAEDAH KULTUR TISU

Oleh

MOHAMAD SUHAIMI BIN OTHMAN

Tesis yang diserahkan untuk memenuhi keperluan

bagi Ijazah Sarjana Sains

April 1997

MIKROFIS
4595

Untuk isteriku Ruzaini dan anak-anakku , Izzuddin, Aifa , Siti Samihah, Syamim Dan Zaffan yang tersayang.....

PENGHARGAAN

Saya ingin mengucapkan ribuan terima kasih kepada Pengurus Besar Lembaga Kemajuan Kelantan Selatan (KESEDAR) kerana memberikan kebenaran cuti bergaji penuh kepada saya bagi melanjutkan pelajaran dan juga kepada Jabatan Perkhidmatan Awam yang memberikan bantuan kewangan melalui biasiswa yang ditawarkan

Saya juga ingin mengucapkan ribuan terima kasih kepada Dekan Pusat Pengajian Sains Kajihayat USM kerana menerima saya melanjutkan pelajaran di Pusat Pengajian ini. Ucapan terima kasih yang tidak terhingga kepada penyelia saya iaitu Prof. Dr. Christopher Teo daripada Pusat Pengajian Kajihayat yang telah banyak membantu dan membimbing saya semasa menjalankan penyelidikan. Saya juga ingin menyampaikan penghargaan saya kepada Prof. Madya Dr. Tan Sai Tee dan Dr. Razip Samian yang membenarkan saya menggunakan beberapa kemudahan makmal mereka. Ucapan terima kasih juga ditujukan kepada Prof. Dr. Baharudin Salleh dan Prof.Madya Dr.Zainal Abidin yang telah memberikan beberapa bahan penulisan serta kesudian mereka membantu dan menasihati saya dalam beberapa aspek yang berkaitan dengan kerja-kerja yang saya jalankan.

Ucapan terima kasih yang tidak terhingga diucapkan kepada rakan-rakan saya iaitu Siva, Puan Chan Lai Keng, Aung Min, Sunil Jinadasa, Hamdan Pane, Nallamai, Punitha dan Liew atas kesudian membantu dan memberikan kerjasama kepada saya sepanjang tempoh penyelidikan dijalankan.

Saya juga berterima kasih kepada Ketua Kerani En. Ahmad Bin Abdullah di Ibu Pejabat Bahagian Sistem Maklumat dan Penyelarasan KESEDAR kerana banyak membantu dalam menguruskan kebajikan saya semasa ketiadaan saya di pejabat.

Buat anak-anak yang tersayang Mohd.Izzuddin, Mohd.Aifa, Siti Samihah, Mohd.Syamim dan Mohd. Zaffan yang merupakan pengukuh Iltizam saya untuk terus belajar mengejar pengetahuan serta yang teristimewa untuk isteri tersayang Ruzaini Shamsuddin yang sentiasa berada di sisi bersama membantu dan memberikan semangat dan dorongan kepada saya dalam menyiapkan kajian ini.

Saya juga ingin merakamkan ingatan terima kasih yang tidak terhingga buat ayahanda dan bonda serta ahli-ahli keluarga yang mencetuskan azam saya untuk bersaing seiringan dengan yang lain dalam meneroka lautan ilmu yang tiada tepinya ini .Terakhir sekali saya mengucapkan ribuan terima kasih kepada individu-individu yang telah membantu saya secara langsung atau tidak langsung semasa saya menjalankan penyelidikan di sini. Semoga Allah membalas jasa baik kalian.

JADUAL KANDUNGAN

		Muka Surat
DEDIKASI		ii
PENGHARGAAN		iii
JADUAL KANDUNGAN		v
SENARAI JADUAL		viii
SENARAI RAJAH		x
ABSTRAK		xii
ABSTRACT		xiv
1	**PENGENALAN**	1
2	**TINJAUAN PERPUSTAKAAN**	7
	2.1 Biologi asparagus	7
	2.2 Pemilihan dan pembiakbakaan asparagus	9
	2.3 Penentuan seks pokok asparagus	11
	2.4 Kultur tisu asparagus	13
	2.5 Pembiakan langsung asparagus tanpa pembentukan kalus	14
	2.6 Penjanaan semula anak benih asparagus daripada kalus	19
	2.7 Morfologi biji benih dan kecergasan tanaman	23
	2.8 Kepentingan elektroforesis dalam bidang kultur tisu	25
3	**BAHAN DAN KAEDAH**	27
	3.1 Kajian fizikal biji benih	27
	3.2 Kajian percambahan biji benih melalui kaedah *in vitro*	27
	3.2.1 Pengsterilan biji benih	27
	3.2.2 Pengkulturan biji benih	28
	3.3 Kaitan saiz biji benih ke atas percambahan dan pertumbuhan	28
	3.4 Kaitan kecergasan biji benih *in vitro* dengan pertumbuhan pokok di lapangan	29
	3.4.1 Aklimatisasi anak benih *in vitro*	29
	3.4.2 Penanaman di lapangan	30

3.4.2.1 Penyediaan tanah 30
3.4.2.2 Penyedian bahan tanaman kajian 30
3.4.2.3 Penanaman 30
3.4.2.4 Pengumpulan data 31
3.5 Kesan kecergasan biji benih berbeza terhadap pertumbuhan anak benih kultur tisu. 31
3.6 Kajian mengenai kecergasan individu biji benih bagi tujuan pemilihan 33
3.7 Penentuan medium yang sesuai untuk penggandaan pucuk dan pengakaran 34
3.7.1 Kesan kombinasi NAA dan BA terhadap pembentukan pucuk berganda dan pengakaran 34
3.7.2 Kesan kombinasi NAA dan kinetin terhadap pembentukan pucuk berganda dan pengakaran. 34
3.7.3 Kesan ansimidol dalam meningkatkan bilangan pucuk berganda dan pengakaran. 35
3.8 Kajian perbandingan pertumbuhan pucuk berganda dan pengakaran menggunakan eksplan yang diambil daripada bahagian sulur yang berbeza. 35
3.9 Mengenalpasti ciri-ciri biji benih yang mengeluarkan pokok jantan dan betina. 36
3.10 Penggunaan kaedah elektroforesis bagi mengenalpasti jantina tanaman asparagus. 37
3.10.1 Penyediaan sampel 37
3.10.2 Pengekstrakan protein 38
3.10.3 Pemasangan alat radas elektroforesis. 38
3.10.4 Penyediaan gel akrilamida pemisah 39
3.10.5 Penyediaan gel pemadat 39
3.10.6 Operasi elektroforesis 40
3.10.7 Pewarnaan dan penyahwarnaan 40
4 KEPUTUSAN 42
4.1 Ciri-ciri biji benih *Asparagus officinalis* L. Var. Mary Washington 42

4.2	Percambahan biji benih	45
	4.2.1 Ciri-ciri percambahan	45
	4.2.2 Ciri-ciri anak benih	45
4.3	Kaitan saiz biji benih ke atas percambahan, bilangan pucuk dan akar	48
	4.3.1 Peratus percambahan	48
	4.3.2 Pengeluaran tiler	51
	4.3.3 Pengeluaran akar	51
	4.3.4 Ketinggian tiler	51
4.4	Kaitan ciri-ciri kecergasan biji benih *in vitro* dengan pertumbuhan pokok di lapangan	55
4.5	Kesan kecergasan anak benih kultur tisu asparagus yang berasal dari biji benih	57
4.6	Kajian mengenai kecergasan individu biji benih bagi tujuan pemilihan.	61
4.7	Penentuan medium yang sesuai untuk penggandaan pucuk dan pengakaran	65
	4.7.1 Kesan NAA dan BA dalam pembentukan pucuk serta akar	65
	4.7.2 Kesan NAA dan kinetin dalam pembentukan pucuk serta akar	69
	4.7.3 Kesan ansmidol dalam meningkatkan bilangan pucuk dan pengakaran	74
4.8	Kesan pengsterilan ke atas kadar pencemaran dan kemandiran eksplan	81
4.9	Kesan eksplan yang diambil dari bahagian sulur yang berbeza ke atas keupayaan pertumbuhan.	81
4.10	Mengenalpasti ciri-ciri biji benih yang menghasilkan pokok asparagus jantan dan betina	84
4.11	Penggunaan kaedah elektroforesis bagi mengenal seks tanaman	84
5	**PERBINCANGAN**	87
6	**KESIMPULAN**	99
BIBLIOGRAFI		101
LAMPIRAN-LAMPIRAN		107

SENARAI JADUAL

			Muka surat
Jadual 1.1	:	Kandungan zat permakanan yang terdapat pada sulur asparagus (setiap 100 g)	2
Jadual 4.1	:	Pengaruh tiler induk asas yang berlainan yang telah disubkultur ke atas kecergasan pokok yang ditunjukkan oleh bilangan pucuk per pokok ,ketinggian pokok, diameter pokok dan hasil yang dikeluarkan.	56
Jadual 4.2	:	Kesan kecergasan biji benih yang berbeza ditunjukkan melalui tiler induk asas berlainan yang telah disubkultur ke atas kecergasan pokok yang ditunjujjan oleh bilangan pucuk per pokok, ketinggian pokok, diameter pokok dan hasil yang dikeluarkan.	58
Jadual 4.3	:	Ciri-ciri pokok asparagus yang dihasilkan oleh setiap anak benih.	62
Jadual 4.4	:	Gerakbalas pokok yang dihasilkan dari pengkulturan belahan anak benih asparagus dalam medium pepejal MS + NAA + BA + 20g sukrosa + 7g agar. Pemerhatian dilakukan selepas 8 minggu.	67
Jadual 4.5	:	Kesan BA dan NAA ke atas pembentukan pucuk daripada belahan anak benih selepas 8 minggu di kultur.	68
Jadual 4.6	:	Kesan kinetin dan NAA ke atas pembentukan pucuk daripada belahan anak benih selepas 8 minggu dikultur.	71
Jadual 4.7	:	Gerakbalas pokok yang dihasilkan dari pengkulturan belahan anak benih asparagus dalam medium pepejal MS + NAA + kinetin + 20gm sukrosa + 7 gm agar. Pemerhatian dilakukan selama 8 minggu.	72
Jadual 4.8	:	Gerakbalas pokok yang dihasilkan dari pengkulturan belahan anak benih asparagus dalam medium pepejal MS + NAA + kinetin + ansimidol + 20 gm sukrosa + 7 gm agar. Pemerhatian dilakukan selama 8 minggu.	75
Jadual 4.9	:	Kesan kombinasi ansimidol + NAA + kinetin ke atas anak benih asparagus yang dikultur.	76

Jadual 4.10 :	Pengaruh kedudukan matatunas yang diambil daripada bahagian sulur yang berlainan selepas 8 minggu dikultur.	82
Jadual 4.11 :	Keupayaan pertumbuhan pucuk dan tunas selepas 8 minggu di dalam kultur MS + 0.2 mgl-1 NAA+ 0.2 kinetin +1.0 ansimidol + 7 gm agar + 20 gm sukrosa pada pH 5.7.	83
Jadual 4.12 :	Pengaruh saiz biji benih dan bilangan tiler dalam menentukan seks pokok asparagus yang akan dihasilkan.	85

SENARAI RAJAH

		Muka surat
Rajah 4.1 :	Taburan berat biji benih *Asparagus officinalis* L. var Mary Washington.	43
Rajah 4.2 :	Bentuk biji benih *Asparagus officinalis* L. var Mary Washington dinyatakan sebagai nisbah panjang pada lebar biji benih	44
Rajah 4.3 :	Percambahan biji benih *Asparagus officinalis* L. yang dikultur di dalam medium 1/2 MS + 7 g agar + 25 g sukrosa pada pH 5.7	46
Rajah 4.4 :	Taburan tiler *Asparagus officinalis* L. var Mary Washington pada minggu ke 8 percambahan	47
Rajah 4.5 :	Taburan akar *Asparagus officinalis* L. var Mary Washington pada minggu ke 8 percambahan.	49
Rajah 4.6 :	Peratus percambahan biji benih asparagus yang berlainan berat di kultur di dalam medium 1/2 MS + 7 g agar + 25 g sukrosa pada pH 5.7 selama 8 minggu	50
Rajah 4.7 :	Peratus pengeluaran tiler dari biji benih yang berlainan berat di kultur di dalam medium 1/2 MS + 7 g agar + 25g sukrosa pada pH 5.7 selama 8 minggu	52
Rajah 4.8 :	Peratus pengeluaran akar dari biji benih yang berlainan berat di kultur di dalam medium 1/2 MS + 7 g agar + 25g sukrosa pada pH 5.7 selama 8 minggu	53
Rajah 4.9 :	Min tinggi tiler anak benih yang berlainan berat di kultur di dalam medium 1/2 MS + 7 g agar + 25g sukrosa pada pH 5.7 selama 8 minggu	54
Rajah 4.10 :	Pokok asparagus yang berasal dari belahan anak benih *in vitro* yang mengeluarkan satu tiler pada minggu ke 8 percambahan.	59
Rajah 4.11 :	Pokok asparagus yang berasal dari belahan anak benih *in vitro* yang mengeluarkan lima tiler pada minggu ke 8 percambahan.	60

Muka surat

Rajah 4.12 : Corak pertumbuhan tisu asparagus yang dikultur di dalam medium pepejal MS yang ditambah dengan pengawal atur tumbesaran NAA pada kadar 0.2 $mg.l^{-1}$ dan BA pada kadar **A.** 0.0 $mg.l^{-1}$,**B.** 0.2 $mg.l^{-1}$, **C.** 0.4 $mg.l^{-1}$, **D.** 0.6 $mg.l^{-1}$, **E.** 0.8 $mg.l^{-1}$ dan **F.** 1.0 $mg.l^{-1}$. 66

Rajah 4.13 : Corak pertumbuhan tisu asparagus yang dikultur di dalam medium pepejal MS yang ditambah dengan pengawal atur tumbesaran NAA pada kadar 0.2 $mg.l^{-1}$ dan Kinetin pada kadar **A.** 0.0 $mg.l^{-1}$,**B.** 0.2 $mg.l^{-1}$, **C.** 0.4 $mg.l^{-1}$, **D.** 0.6 $mg.l^{-1}$, **E.** 0.8 $mg.l^{-1}$ dan **F.** 1.0 $mg.l^{-1}$. 70

Rajah 4.14 : Pertumbuhan tisu asparagus yang dikultur ke dalam medium MS + 1.0 $mg.l^{-1}$ ansimidol + 0.05 $mg.l^{-1}$ NAA + 0.05 $mg.l^{-1}$ Kinetin. 78

Rajah 4.15 : Pertumbuhan tisu asparagus yang dikultur ke dalam medium MS + 1.0 $mg.l^{-1}$ ansimidol + 0.10 $mg.l^{-1}$ NAA + 0.05 $mg.l^{-1}$ Kinetin. 79

Rajah 4.16 : Pertumbuhan tisu asparagus yang dikultur ke dalam medium MS + 1.0 $mg.l^{-1}$ ansimidol + 0.2 $mg.l^{-1}$ NAA + 0.2 $mg.l^{-1}$ Kinetin. 80

Rajah 4.17 : Corak jalur protein pokok asparagus jantan (M) dan betina (F) dengan penanda berat molekul (C). Jalur protein yang dihasilkan menunjukkan tidak terdapat apa-apa perbezaan diantara pokok asparagus pokok jantan dan betina. 86

ABSTRAK

Seks tanaman asparagus tidak dapat ditentukan melalui morfologi biji benih. Biji benih yang berlainan saiz mengeluarkan satu atau lebih tiler tetapi ini tidak menunjukkan potensi pengeluaran hasil yang sebenar. Oleh yang demikian ciri-ciri pemilihan klon yang unggul tidak bergantung kepada saiz atau bilangan tiler yang dikeluarkan oleh biji benih. Walaubagaimanapun setiap biji benih mempunyai potensi pengeluaran hasil yang berbeza antara satu sama lain. Oleh itu pemilihan berdasarkan setiap biji benih perlu dilakukan.

Bagi meningkatkan bilangan tiler yang dihasilkan oleh eksplan, penambahan auksin dan sitokinin diperlukan. Mengggunakan kinetin bersama medium Murashige and Skoog (MS) adalah lebih baik daripada benziladenina (BA) kerana kebanyakan anak benih yang dihasilkan adalah sempurna. Masalah dalam kultur tisu ialah penghasilan kalus. Penambahan α-cyclopropyl-α-(4 methoxyphenyl) - 5-pyrimidinemethanol (ansimidol) dapat membantu mengurangkan masalah ini. Medium yang paling sesuai bagi pembiakan *in vitro* asparagus ialah medium MS + 0.2 $mg.l^{-1}$ kinetin + 0.2 $mg.l^{-1}$ NAA + 1.0 $mg.l^{-1}$ ansimidol. Ia didapati menghasilkan lebih banyak tiler dan akar serta pokok yang dihasilkan adalah lebih sempurna.

Tisu yang paling baik sebagai eksplan ialah tisu yang diambil daripada bahagian atas tiler. Tisu ini mempunyai kadar kontaminasi yang rendah iaitu 25% dibandingkan 48% dan 59% bagi tisu yang

diambil dari tengah dan bawah sulur, masing-masing. Ianya juga mempunyai kemandiran yang tinggi iaitu sehingga 97% berbanding 64% dan 18% bagi sulur tengah dan bawah, masing-masing. Ia juga mengeluarkan bilangan tiler dan akar yang lebih baik.

SELECTION AND PROPAGATION OF ASPARAGUS (*Asparagus officinalis.* L.) VAR. MARY WASHINGTON THROUGH TISSUE CULTURE TECHNIQUE.

ABSTRACT

Sex of asparagus plant cannot be determined by seed morphology. Each seed of different size produced one or more tillers but did not reflect subsequent yield. Therefore selection of elite clone cannot depend entirely on seed size and number of tillers produced by a seedling.

Auxin and cytokinin are required to increase the number of tiller produced by an explant . Kinetin in combination with Murashige and Skoog (MS) and α-naphthaleneacetic acid (NAA) is better than benzyladenine (BA) because most of the seedlings produced are normal. The main problem encountered in asparagus tissue culture was the production of callus. Addition of α-cyclopropyl-α-(4 methoxyphenyl)-5-pyrimidinemethanol (ancymidol) suppressed callus formation. The most suitable medium for *in vitro* production of asparagus was MS medium + 0.2 $mg.l^{-1}$ kinetin + 0.2 $mg.l^{-1}$ NAA + 1.0 $mg.l^{-1}$. It not only give more shoots and roots but produced better seedlings.

The most suitable source of explant tissue was from the upper apex of tiller. It gave lower contamination rate of only 25% compared to 48% and 59% for explant obtained from middle and lower parts of the tiller, respectively. The high survival rate of up to 97% was obtained from apical tissue compared to 64% and 18% for tissue from middle and lower part of tiller, respectively. Apical tissue also produced better root and shoot.

BAB 1

PENGENALAN

Pokok asparagus (*Asparagus officinalis* L.) berasal dari Timor Mediterranean dan Asia Minor. Ia telah dikenali lebih 2000 tahun yang lalu. Asparagus adalah sejenis tanaman sayuran saka. Tumbuhan ini biasanya ditanam di kawasan iklim berhawa sederhana. Menurut Nichols (1992) terdapat permintaan dunia yang meningkat terhadap asparagus. Asparagus dalam bentuk yang segar mempunyai permintaan yang lebih tinggi berbanding dengan asparagus yang telah dibeku atau yang ditinkan. Pengeluaran asparagus di kawasan iklim yang berhawa sederhana hanya dapat dilakukan pada akhir musim bunga dan awal musim panas. Ini bermakna dalam tempoh selama lebih kurang enam bulan asparagus segar tidak dapat dibekalkan oleh negara-negara pengeluar yang terdapat di kawasan iklim berhawa sederhana. Ini membuka peluang kepada pengeluar di kawasan Tropika untuk memasuki pasaran walaupun kualiti asparagus yang dikeluarkan secara umumnya adalah lebih rendah.

Asparagus mempunyai nilai zat permakanan yang tinggi. Selain daripada itu ia dikatakan mempunyai khasiat yang tertentu dari segi perubatan. Nilai zat permakanan asparagus adalah seperti dalam Jadual 1.1.

Di Malaysia asparagus merupakan tanaman yang agak baru. Sehingga kini asparagus ditanam secara komersial di Kundasang, Sabah dan Cameron Highlands di Pahang (Hanada *et al.*, 1985). Buat masa ini hanya dua varieti asparagus yang menun-

Jadual 1.1 : Kandungan zat permakanan yang terdapat pada sulur pokok asparagus (setiap 100g) .

Perkara	Asparagus Hijau	Asparagus Putih
Kalori (cal.)	20.0 - 22.0	16.0 - 18.0
Protein (g.)	2.50 - 3.00	1.70 - 2.00
Kalsium (mg.)	20.0 - 25.0	12.0 - 17.0
Besi (mg.)	1.40 - 1.50	0.90 - 1.10
Gula (mg.)	1.70 - 1.20	2.00 - 2.50
Kanji (g)	0.30 - 0.35	0.20 - 0.25
Vitamin A (I.U.)	750 - 1200	50 - 100
Vitamin C (mg.)	50.0 - 55.0	25.0 - 30.0
Vitamin B1 (mg.)	0.20 - 0.25	0.10 - 0.15
Vitamin B2 (mg.)	0.15 - 0.10	0.05 - 0.10

Sumber : Shimuzu, S. (1977)

jukkan pertumbuhan yang baik dan memberikan hasil yang memuaskan iaitu Mary Washington dan Imperial (Mohd. Idris, 1990).

Menurut Dasar Pertanian Negara 1992 - 2010 (Anon., 1993) , pengeluaran sayur-sayuran akan dipertingkatkan bagi memenuhi permintaan tempatan dan juga untuk dieksport. Pengeluaran juga akan dipelbagaikan. Kawasan khusus termasuk tanah tinggi akan dikenalpasti dan dizonkan sebagai kawasan tanaman sayur-sayuran dengan mengambilkira faktor kemampanan, kualiti dan piawaian termasuk keperluan kesihatan akan diberi penekanan. Sehubungan dengan itu asparagus adalah antara jenis sayuran yang didapati berpotensi untuk dimajukan terutamanya di kawasan tanah tinggi yang lebih rendah suhunya.

Pokok asparagus pada kebiasaannya ditanam menggunakan biji benih. Penggunaan biji benih walaupun dari varieti yang sama tidak memberikan pertumbuhan yang seragam. Selain daripada itu terdapat kesukaran mendapatkan bekalan biji benih daripada pembekal dan kalau ada pun kualitinya adalah diragui. Lawatan penulis ke beberapa kawasan penanaman asparagus di Cameron Highland mendapati ada petani yang menggunakan biji benih daripada pokok-pokok asparagus yang mereka tanam di kebun mereka sebagai bahan tanaman. Perkara yang sedemikian adalah tidak sesuai dari segi amalan pertanian kerana biji benih yang dihasilkan itu bukan dari pendebungaan terkawal dan tidak diketahui dengan tepat asal-usul induknya. Oleh yang demikian mutu biji benih yang dihasilkan adalah tidak terjamin.

Selain menggunakan biji benih sebagai bahan tanaman pembiakan asparagus boleh juga dilakukan menggunakan tunas sulur dari rumpun berumur lebih daripada satu tahun sebagai bahan tanaman tampang. Walaubagaimanapun penggunaan bahan tanaman tampang ini memerlukan tenaga buruh yang ramai dan mengambil masa yang agak panjang untuk melaksanakannya.

Kebanyakan kerja pembiakbakaan tanaman menggunakan kaedah yang berasaskan penyingkiran pokok yang kurang baik dari segi pengeluaran hasil dalam pemilihan yang dilakukan. Oleh kerana asparagus adalah pokok saka, pemilihan pokok yang mempunyai hasil yang tinggi hanya boleh dilakukan dan diketahui setelah pokok berumur 6 hingga 8 tahun (Hanna, 1941) dan menurut (Fallon *et al.*, 1989) pembiakbakaan asparagus menggunakan kaedah tradisi melalui proses yang panjang pada kebiasaannya mengambil masa 15 hingga 20 tahun bagi membolehkan pengeluaran kuantiti biji benih secara komersial dapat dikeluarkan.

Pembiakan tampang bagi asparagus adalah amat penting kerana biji benih yang dihasilkan biasanya berada dalam nisbah 50% jantan dan 50% pokok betina. Pokok asparagus jantan diperlukan dalam penanaman komersial kerana ia memberikan hasil 20 - 30 % lebih tinggi daripada pokok asparagus betina (Tiedjan, 1925; Tsay *et al.*, 1982). Pembiakan klon menggunakan keratan batang tidak boleh dilakukan dan pembiakan tampang melalui pembahagian rizom adalah lambat dan mahal. Kaedah *in vitro,* iaitu , antara salah satu kaedah pembiakan tampang bagi mempercepatkan pengklonan pokok ini

daripada sulur telah dijelaskan oleh Yang (1977). Pembiakan klon pokok asparagus secara *in vitro* menghasilkan pokok yang lebih seragam dibandingkan dengan pokok yang dihasilkan melalui biji benih (Uesugi *et al.*, 1992). Selain daripada dapat mengatasi masalah variasi ia juga berpotensi bagi mendapatkan pokok yang seragam dari segi kecergasan dan kualiti pengeluarannya. Menurut Nikoloff (1988) pengeluaran hasil yang diperolehi menggunakan kaedah pengklonan ini memberikan dua hingga tiga kali ganda lebih tinggi berbanding dengan pengeluaran hasil tanaman yang menggunakan biji benih.

Ujikaji yang dijalankan ini adalah untuk mendapatkan kaedah yang sesuai bagi tujuan pengklonan ini. Bahan tanaman yang digunakan adalah *Asparagus officinalis* L. var Mary Washington iaitu salah satu varieti yang didapati sesuai dengan keadaan di Malaysia dan digunakan dengan meluasnya oleh pekebun-pekebun di sini.

Kajian yang dijalankan ini secara spesifiknya adalah untuk mencapai objektif-objektif yang berikut: -

1. Mengkaji kaitan antara sifat fizikal biji benih dan kecergasan anakbenih serta kemungkinan menggunakannya dalam proses pemilihan dan pembiakan tanaman.

2. Mengenalpasti pokok induk elit bagi pembiakan klonal

3. Mendapatkan satu medium yang sesuai untuk pembiakan *in vitro* pokok asparagus.

4. Mendapatkan bahagian sulur asparagus yang sesuai untuk dikultur secara *in vitro*

5. Mengenalpasti seks pokok asparagus di awal pertumbuhan melalui ciri-ciri yang telah direkod semasa pokok masih di peringkat biji benih sehingga pengeluaran bunga dan penggunaan elektroforesis bagi mengesan perbezaan seks tanaman tersebut.

Melalui kajian ini diharapkan satu kaedah kultur tisu yang lengkap akan dapat dirumuskan bagi memilih dan membiak pokok asparagus dan seterusnya digunakan dalam membekalkan bahan tanaman bagi penanaman secara komersial.

BAB 2

TINJAUAN PERPUSTAKAAN

2.1 Biologi asparagus

Pokok asparagus adalah sejenis tumbuhan monokotiledon yang tergolong dalam famili Liliaceae. Nama asparagus dipercayai diperolehi daripada perkataan Greek purba 'asparagos' bermakna ' yang membengkak' iaitu satu rujukan kepada tabiatnya di awal pengeluaran pucuk (Fox, 1993)

Sebelum abad ke 17, ahli-ahli herba purba lebih menumpukan perhatian mereka kepada ciri-ciri penyembuhan penyakit atau perubatan yang ada pada pokok asparagus lebih daripada kegunaannya sebagai bahan makanan (Henslow, 1911). Kenyataan pertama yang menyebut ianya sebagai sayuran didokumentasikan di dalam biara Perancis dalam abad ke 17 (Reuther, 1984).

Asparagus mengandungi asparagin yang dipercayai dapat memulihkan kesihatan tubuh badan serta menyembuhkan beberapa jenis penyakit seperti penyakit lemah jantung dan darah tinggi (Wan Darman dan Kim San, 1985). *Asparagus scaber* dan *Asparagus africanus* telah digunakan oleh penduduk asli wanita di Afrika Selatan sebagai ubat meransangkan pertumbuhan rambut dengan mencampurkan daun pokok tersebut dengan minyak (Lovelock, 1972).

Bilangan spesis dalam genus asparagus ini tidak diketahui dengan tepat. Bailey dan Bailey (1976) menganggarkan terdapat antara 100 dan 300 spesis dalam genus ini sementara Lovelock (1972) menganggarkan terdapat lebihkurang

120 spesis. Kebanyakan spesis ini tumbuh dan digunakan sebagai pokok hiasan. Hanya *Asparagus officinalis* sahaja yang boleh dimakan.

Pokok asparagus boleh hidup bertahun-tahun lamanya tanpa perlu ditanam semula selepas dituai. Di negeri-negeri iklim hawa sederhana, di bawah keadaan yang sesuai, sesuatu tanaman asparagus boleh hidup dan kekal produktif bagi tempoh 15 hingga 20 tahun.

Pokok asparagus tumbuh dengan membentuk rumpun yang bercabang-cabang dan mempunyai rizom yang keras serta mempunyai mata tunas di bahagian hujung rizom yang berkenaan. Matatunas ini akan tumbuh dan menghasilkan pucuk muda atau sulur yang boleh dimakan. Pada pokok matang, sulur tumbuh pada kadar 10 cm sehari dan dalam tempoh tiga hingga lima hari selepas kemunculannya ia telah sedia untuk dituai. Cabang rizom yang tua akan mati dan akan diganti dengan rizom yang muda. Batangnya tumbuh daripada mata tunas yang terdapat pada rizom. Batang ini tumbuh menegak sehingga 1 - 2 m tinggi dan mempunyai beberapa cabang. Saiz batang biasanya berdiameter 0.5 hingga 2.0 cm. Batang asparagus menjadi semakin keras dan berserabut apabila ia semakin membesar. Daun asparagus membentuk daun halus seperti jarum pada buku batang. Bilangan daun pada setiap buku ialah antara lima hingga 12. Sistem akarnya terdiri daripada akar utama yang berbentuk tiub berdiameter 0.5 hingga 1.0 cm. Dari sini lebih banyak akar serabut akan tumbuh.

Akar boleh tumbuh hingga 2 m dalam keadaan mendatar dan 3 m dalam menegak pada keadaan tanah yang sesuai tetapi kebanyakan akar akan bertebaran dalam jarak 30 cm dalam tanah.

Pokok asparagus adalah dioesius. Kadang-kadang terdapat bunga yang sempurna iaitu ciri-ciri betina dan jantan terdapat pada satu bunga tapi keadaan ini jarang-jarang berlaku. Menurut Lewitsky (1925) terdapat perbezaan yang meluas dalam perkembangan pistil dalam bunga jantan. Walaubagaimanapun biasanya bunga ini akan gugur sebelum dapat berkembang sepenuhnya. Pistil yang sedemikian mungkin telah hampir berfungsi bagi mengeluarkan buah partenokarpi yang mengeluarkan biji benih. Biji benih yang berasal dari buah ini selalunya berkembang secara separa normal yang dapat dilihat daripada perubahan mengejut saiz dan perkembangan integumen yang lemah.

Ellison dan Scheer (1958) menyatakan bahawa potensi penghasilan pokok asparagus jantan dan betina mempunyai korelasi yang tinggi dengan pertumbuhan batang selepas beberapa tahun. Satu korelasi yang positif wujud antara bilangan batang dan bilangan sulur dan antara diameter batang dan diameter sulur. Maklumat ini berguna kepada ahli pembiakbaka apabila rekod pengeluaran hasil tidak mencukupi untuk dirujuk.

2.2 Pemilihan dan pembiakbakaan asparagus

Sebagaimana dalam tanaman dioesius yang lain populasi tulin asparagus dihasilkan melalui kacukan kandung antara pokok betina (XX) dan pokok jantan (XY). Thevenin (1968) mengkulturkan anter daripada pokok jantan dan

menghasilkan pokok super jantan (YY). Apabila pokok-pokok jantan itu dikacukkan dengan pokok betina (XX), keseluruhan progeni mangandungi pokok jantan (XY).

Ellison dan Schermerhorn (1958) mendapati pokok yang mempunyai sulur awal yang banyak semasa musim bunga memberikan pengeluaran hasil yang tinggi. Mereka telah membandingkan tanaman yang mempunyai lima batang sulur pada hari pertama musim bunga dengan pokok kawalan. Mereka dapati dalam dua tahun berturut-turut pokok-pokok yang mengeluarkan lima sulur pada hari pertama musim bunga itu mengeluarkan hasil 42% lebih tinggi selepas tahun pertama dan 94% lebih tinggi pada tahun kedua. Kecenderungan tersebut berterusan lebih enam tahun berturut-turut. Korelasi yang positif diperolehi antara penghasilan awal dalam minggu pertama musim bunga dengan jumlah pengeluaran hasil. Oleh yang demikian, bilangan sulur yang banyak di awal musim bunga adalah antara satu ciri bagi pemilihan dan ia mungkin boleh digunakan sebagai satu indeks petunjuk bagi satu cara pemilihan yang mudah daripada jumlah pengeluaran. Ellison *et al.*, (1960) menyatakan bahawa pokok asparagus yang paling dikehendakki ialah pokok yang mengeluarkan bilangan sulur besar yang tinggi, cenderung mengeluarkan hasil yang awal dan juga dicirikan oleh kecergasan rumpun yang tinggi yang ditunjukkan melalui bilangan dan diameter batang. Ciri-ciri ini mempunyai korelasi yang rapat dan boleh digunakan sebagai alternatif kepada induk yang hendak dipilih.

Pokok jantan mengeluarkan hasil yang lebih tinggi, iaitu, antara 20 hingga 30% lebih tinggi daripada pokok betina (Tiedjens, 1925; Tsay *et al.*, 1982). Nisbah pokok jantan dan betina di ladang biasanya berada pada kadar 1:1. Pemilihan yang berdasarkan seks tidak dapat dilakukan ketika pokok masih muda. Sehingga

sekarang masih belum terdapat cara yang berkesan dan efektif dari segi komersial bagi membezakan seks pokok asparagus semasa masih dalam bentuk biji benihnya ataupun ketika pokok masih berada diperingkat yang muda. Pemilihan berdasarkan seks hanya dapat dipastikan apabila ia berbunga dan ini mungkin mengambil masa lebihkurang dua tahun selepas percambahan benih.

2.3 Penentuan seks pokok asparagus

Pokok asparagus jantan mengeluarkan hasil yang lebih tinggi dan hidup yang lebih panjang daripada pokok asparagus betina (Fallon dan Nikoloff, 1986). Oleh yang demikian mengenalpasti seks tanaman ini diperingkat yang lebih awal adalah penting bagi tujuan pengeluaran hasil yang lebih tinggi dan dalam tempoh yang lebih lama.

Pokok jantan didapati berbunga dan mengeluarkan hasil yang lebih awal (Robbin dan Jones, 1928). Ia mengeluarkan hasil yang lebih tinggi dan mempunyai sulur yang lebih kurus. Hayase dan Komochi (1954) menunjukkan bahawa terdapat perbezaan antara pokok jantan dan betina asparagus dalam ketahanannya terhadap kaliam klorat. Pokok betina didapati mengalami kerosakan yang teruk apabila dirawat dengan kimia ini sedangkan ianya tidak memberi kesan kepada pokok asparagus jantan. Walaubagaimanapun cara ini adalah kurang sesuai digunakan kerana kaedah memusnahkan pokok menyebabkan perbelanjaan yang besar . Abe dan Kameya (1986) telah berjaya meransangkan pembungaan asparagus lebih awal dengan merendamkan biji benih dengan atrazine atau diuron.

Pokok asparagus mengambil masa 12 hingga 18 bulan untuk berbunga di kawasan hawa sederhana dan enam bulan di kawasan Tropika. Mengenalpasti seks tanaman semasa pokok masih diperingkat biji benih akan dapat memudahkan kerja-kerja pemilihan bagi penanaman dan mengelakkan penanaman pokok betina yang boleh menyebabkan berlakunya pengurangan pengeluaran hasil. Franken (1970) mendapati biji benih yang menghasilkan pokok betina bercambah lebih awal daripada biji benih yang menghasilkan pokok jantan. Beliau juga mendapati bahawa pokok betina boleh dikenalpasti dengan lebih awal melalui ciri pengeluaran batangnya yang berkurangan dengan agak besar apabila hampir mengeluarkan buah .

Flory (1932) dan Kamo (1929) telah cuba mengenalpasti pasangan kromosom yang dapat menentukan seks asparagus secara sitologi tetapi tiada pasangan heteromorfik yang dapat dikesan. Ombbrello dan Garrison (1987) telah mengekstrak hormon gibberellin dan sitokinin pada hujung sulur asparagus dari pokok jantan dan betina serta menganalisanya menggunakan alat ' High Performance Liquid Chromatography' (HPLC) dan mendapati bahawa seks tanaman asparagus dikawal sebahagiannya oleh tingkat sitokinin atau oleh nisbah sitokinin dan gibberellin.

Franken (1970) telah mengkaji ciri-ciri seks dalam biji benih asparagus dengan menggolongkan biji benih asparagus kepada empat kelas berdasarkan diameter iaitu <2.5mm, 3.5 - 4.49 mm dan > 4.5mm. Beliau dapati bahawa tidak

terdapat kaitan antara saiz biji benih dengan nisbah seks. Beliau dapati saiz biji benih adalah bergantung kepada bilangan biji benih per beri.

2.4 Kultur tisu asparagus

Penggunaan meluas kaedah kultur tisu ialah dalam bidang mikropagasi untuk mendapatkan bilangan tanaman yang banyak dalam masa yang singkat. Kaedah ini amat berguna dalam membiakkan pokok yang sukar dibiakkan secara biasa atau pokok yang menghadapi masalah lambat membiak. Nikoloff (1988) mendapati pengeluaran hasil melalui teknik pengklonan ini telah berjaya meningkatkan hasil dua hingga tiga kali ganda daripada hasil yang diperolehi menggunakan biji benih.

Kultivar asparagus mengandungi populasi tanaman yang mempunyai perbezaan yang agak besar antara ciri-cirinya. Walaupun dalam kebun asparagus daripada hibrid atau individu dari kumpulan yang sama , boleh terdapat sehingga 25 bentuk perbezaan dalam hasil antara pokok yang mengeluarkan hasil yang tertinggi dan terendah (Nikoloff *et al.*,1986). Pada masa ini adalah tidak mustahil bagi memilih pokok asparagus yang terbaik dan menggandakannya untuk mendapatkan pokok yang mempunyai nilai komersial yang tinggi yang terdiri daripada bahan tanaman yang serupa. Penggunaan kaedah kultur tisu dilihat sebagai cara yang paling sesuai buat masa ini, bagi pembiakan pokok yang terpilih untuk tujuan pengeluaran secara komersial. Melalui kaedah ini perbezaan hasil antara tanaman dapat dikurangkan. Selain daripada itu kebaikan yang diperolehi melalui kaedah pengklonan ini ialah dapat mewujudkan tanaman yang

mempunyai ciri sulur yang sesuai untuk pasaran tertentu. Oleh yang demikian fleksibiliti dan tindakbalas yang cepat ke atas perubahan pasaran dapat dibuat serta masa kerja memajukan varieti baru dapat dipendekkan.

2.5 Pembiakan langsung asparagus tanpa pembentukan kalus.

Pokok yang dibiak dengan perkembangan pucuk secara langsung tanpa melalui kalus dianggap mempunyai kestabilan genetik. Ini terbukti dari penyelidikan terdahulu yang telah dijalankan.

Murashige *et al.* (1972) melaporkan kejayaan mereka membiak pokok asparagus menggunakan pucuk apeks (panjangnya lebihkurang 0.15 mm) yang diambil dari cabang lateral sulur muda. Eksplan disteril dan kemudian dikulturkan ke dalam medium MS yang mengandungi 0.3 $mg.l^{-1}$ NAA + 0.1 $mg.l^{-1}$ kinetin + 40 $mg.l^{-1}$ adenina sulfat + 50 $mg.l^{-1}$ agar Difco Bacto^{R} + 170 $mg.l^{-1}$ $NaH_2PO_4H_2O$. Antara 80% hingga 90% daripada eksplan yang digunakan mengeluarkan pucuk berbilang dan akar . Walaubagaimanapun didapati medium tanpa kinetin membentuk akar yang lebih ektensif. Eksplan yang digunakan mempunyai dom meristem di hujung dengan beberapa primordia daun.

Yang (1977) telah membuat sedikit ubahsuai ke atas kerja yang dilakukan oleh Murashige di atas. Tunas lateral sulur dan tunas pada pucuk tunas dari tunas lateral digunakan sebagai eksplan bagi mengeluarkan pucuk berbilang dan akhirnya membentuk anak benih. Tunas lateral yang terletak di bawah sisik pada hujung sulur diambil dan disterilkan dalam larutan Javex dan kemudian dikulturkan ke atas medium asas MS yang telah ditambah dengan NAA dan

kinetin dalam pelbagai kepekatan. Kultur diletakkan di dalam bilik pertumbuhan pada suhu 27 °C ± 1 °C dan didedahkan kepada keamatan cahaya 3000 lux dengan fotokala 16 jam. Selepas dua hingga tiga bulan, pucuk akan terbentuk. Eksplan dikeluarkan dan dipotong kepada beberapa segmen yang setiap satunya mengandungi satu mata tunas. Segmen ini dikulturkan untuk tempoh enam hingga lapan minggu lagi atas medium yang sama di mana pucuk berbilang seterusnya akan terbentuk. Anak benih akan mengeluarkan akar jika dipindahkan ke atas medium yang sama tetapi tanpa kinetin.

Hasegawa *et al.* (1973) mendapati pembiakan pokok asparagus menggunakan kultur pucuk apeks dan apeks matatunas terminal sulur yang dihasilkan secara *in vitro* adalah sama memuaskan jika dibandingkan dengan eksplan dari matatunas lateral sulur yang diambil dari lapangan. Bilangan pokok yang maksimum diperolehi apabila dikultur dan diberikan pencahayaan selama empat hingga dua puluh jam sehari dengan lampu Gro-lux pada keamatan 1000 lux. Keamatan cahaya perlu dipertingkatkan kepada 3000 hingga 10 000 lux sebelum tumbuhan dipindahkan ke tanah.

Kecergasan pokok adventitus bergantung kepada umur pokok yang mempengaruhi keupayaan pengakaran. Hasil terbaik telah diperolehi dengan menggunakan eksplan dari pokok yang berumur 4 - 5 bulan selepas tempoh pengakaran 4 hingga 8 minggu (Yang dan Clore, 1974a).

Pengakaran eksplan hujung pucuk yang terdiri daripada pelbagai saiz dilakukan dengan mengaruh eksplan dengan 0.5μM NAA setelah eksplan disubkultur ke atas medium bebas kinetin. Masa yang diperlukan untuk pembiakan pokok asparagus sebelum ia sedia untuk dialihtanam ke atas tanah bermula dari eksplan yang mula-mula dikultur mengambil masa antara 6 hingga ke 8 bulan (Yang, 1977) atau dari 10 ke 12 bulan (Tendille dan Lecerf, 1977).

Kadar penggandaan tunas yang disubkultur bergantung kepada kecergasan pucuk dan kedudukan tunas. Pokok yang lebih lengkap diperolehi daripada bahagian bawah dan tengah sulur (Yang, 1977).

Suhu yang optimum bagi pembentukan pucuk daripada potongan hujung pucuk ialah 27 °C. Keamatan cahaya yang optimum untuk pembentukan sulur dan akar ialah 1000 lux pada fotokala 16 jam (Hasegawa *et al.*, 1973). Di bahagian bawah eksplan yang telah mengeluarkan pucuk terdapat tisu yang membengkak seperti kalus dimana akar-akar adventitus terbentuk.

Kadar kemandiran anak benih kurang memuaskan apabila dipindahkan ke tanah masih memerlukan ujikaji bagi memajukan kemampanan anak benih yang dihasilkan melalui kaedah *in vitro* dan amalan pertanian yang dijalankan. Tendille dan Lecerf (1974) menyatakan bahawa mengkultur pucuk meristem yang telah berakar di atas medium nutrien yang mengandungi sukrosa adalah heterotropik, iaitu, tidak berkeupayaan untuk membentuk rizom dan tidak dapat menyesuaikan diri dengan keadaan persekitaran yang ada. Kecacatan dari segi morfologi juga telah disebut oleh Hasegawa *et al.* (1973) sebagai sebab kematian tumbuhan

ketika dialihtanam. Langkah pengkulturan semula pokok yang akan dialihtanam di bawah keamatan cahaya yang tinggi 10 000 lux dicadangkan bagi hasil yang lebih baik kerana pembentukan daun, misalnya pembezaan kladofil pada suhu tertentu diransang oleh keamatan cahaya.

Terdapat kaitan langsung antara keamatan cahaya dan darjah pembentukan daun dan kemandiran pokok yang dialihtanam. Walaubagaimanapun pada 3000 lux tidak ada pengurangan yang ketara dalam pendaunan atau kemandiran pokok yang dapat diperhatikan. Semasa pemindahan pokok dari tabunguji ke dalam pasu di rumah hijau, pokok dalam pasu perlu ditutup dengan plastik dengan kadar yang segera dan kemudian diletakkan di bawah suhu yang secara relatifnya sederhana. Kemandiran pokok yang dialihtanam dalam Jiffy 7 dan diberikan siraman pengkabusan didapati 90% lebih baik pertumbuhannya berbanding dengan di bawah kelembapan relatif iaitu 70% (Yang dan Clore, 1974b).

Eksplan hujung pucuk yang mempunyai saiz yang sangat kecil dan mengalami perkembangan langsung sebagai pokok yang lengkap tanpa melalui fasa kalus didapati mempunyai genetik yang stabil. Menurut Hasegawa *et al.* (1973) bilangan kromosom pokok yang didapati daripada sel didapati konsisten dengan pokok yang asal. Aspek lain berkenaan dengan penggunaan kaedah hujung pucuk ialah kemungkinan menyingkirkan jangkitan virus dengan cara menggunakan meristem apeks yang panjangnya bersaiz kurang dari 0.1 mm (Yang, 1979). Bagi menyingkirkan jangkitan virus AV-1, hujung pucuk yang

panjangnya 0.1 - 0.3 mm boleh digunakan dengan jayanya, tetapi bagi virus AV-2, meristem yang lebih kecil tanpa primordia daun hendaklah digunakan.

Chin (1982) melaporkan dengan mengkulturkan segmen satu tunas sulur ke dalam medium kultur MS yang mengandungi 0.5 μM NAA + 0.5 μM kinetin + 5.0 μM ansimidol, 90% daripada eksplan yang dikultur membentuk pucuk dalam masa 4 minggu berbanding dengan 52% dalam tempoh yang sama sekiranya menggunakan medium yang sama tanpa ansimidol. Apabila anak tumbuhan yang telah berpucuk itu dipindahkan ke medium yang baharu tapi sama jenisnya di akhir minggu ke 4, didapati selepas 5 minggu, anak tumbuhan yang dikultur di atas medium yang mengandungi ansimidol berakar 100% berbanding medium tanpa ansimidol iaitu hanya 26 %. Ini menunjukkan ansimidol mempercepat dan menggalakkan pengeluaran anak tumbuhan dan pengakarannya.

Matsubara (1983) mengkaji rawatan yang diperlukan dalam menggalakkan pengakaran in vitro bagi pucuk apeks dan tunas sisi pokok asparagus jantan dan betina. Sebanyak 79% pucuk yang berasal dari tunas sis pokok jantan didapati berakar apabila dikulturkan ke atas medium MS + 1.0 $mg.l^{-1}$ IBA tetapi rawatan ini tidak berkesan untuk pokok asparagus betina. Selain daripada itu dilaporkan juga bahawa apabila pucuk apeks dan tunas sisi pokok asparagus jantan dan betina dikulturkan ke atas medium asas MS, didapati masa rawatan dua hingga tiga minggu adalah masa yang paling efektif bagi pengakaran eksplan dari tunas sisi pokok jantan dan bagi pucuk apeks betina.

Pengkulturan hujung pucuk asparagus sepanjang 2 mm ke dalam medium pepejal MS yang mengandungi 7 $mg.l^{-1}$ IBA + 0.1 $mg.l^{-1}$ BA selama 4 hari dan kemudiannya diikuti dengan memindahkan ke dalam medium pepejal MS tanpa hormon didapati berjaya mendapatkan pokok yang mempunyai pengakaran yang baik. Sebanyak 90 hingga 95 % eksplan membentuk anak benih yang sedia untuk dialihtanam (Endo dan Shoji,1992).

2.6 Penjanaan semula anak benih asparagus daripada kalus.

Bagi meningkatkan bilangan pokok asparagus, beberapa ujikaji mengenai pembentukan kalus dan penjanaan semula organ-organ adventitus telah dijalankan. Eksplan-eksplan yang berasal dari hujung pucuk, pucuk apeks, meristem-meristem lateral dari sulur, tisu kabus dari segmen yang terletak di bahagian bawah sulur dan sel-sel tunggal kladofil telah diaruh untuk membentuk kalus dengan menambahkan bahan pengawalatur tumbesaran pada medium dasar. Pengekalan kultur kalus dilakukan dalam medium cecair dan juga pepejal. Stimulasi ke atas kalus dibuat bagi mendorongnya mengalami proses organogenesis dengan cara memasukkannya ke dalam media dasar bahan pengawalatur tumbesaran pada kepekatan yang sesuai.

Proses pembezaan sel kalus yang mempunyai bilangan vakuol yang tinggi ini bermula dengan transformasi sel-sel ini kepada sel-sel yang mengandungi sitoplasma yang tumpat, meristemoid atau gumpalan sel-sel embrionik (Reuther, 1984).

Gorter (1965) menggunakan 0.5 cm bahagian pucuk sebagai eksplan dan mengkulturkannya di atas medium Galston-Loo yang ditambah dengan 27 μM NAA. Beliau telah berjaya mengaruh kalus dengan akar mula yang membentuk anak benih dalam medium cecair yang ditambah dengan asid borik. Keterangan mengenai efisiensi pembiakan walaupunbagaimanapun tidak dinyatakan. Kalus yang tumbuh dengan cergasnya didapati daripada dipokotil anak benih yang telah disterilkan dan dikulturkan ke atas medium Linscmaier-Skoog (1965) dan dicampur dengan 4.5 μM 2,4-D dan 1.5 μM kinetin. Ia telah menukarkan corak pertumbuhan dalam masa yang pendek setelah disubkultur dalam medium cecair yang mempunyai komposisi yang sama. Bilangan sel-sel agregat padat membentuk kepada untai globular yang ditafsirkan sebagai embrio. Bilangan unit ini bertambah dengan berkurangnya kepekatan 2,4-D (Wilmar dan Hellendoorn, 1968). Di bawah saiz 2 mm embrio sekali lagi mengalami proses penyahbezaan dalam kultur ampaian. Di antara anak benih yang dipindahkan terdapat bebarapa anak benih tetraploid. Hirisan sulur yang diasingkan dari tunas sisi membentuk kalus pada bahagian hujung bawah hirisan dalam masa 4 - 6 minggu apabila dikultur ke atas medium MS yang ditambah dengan 2.7 μM NAA dan 15% air kelapa (Takatori *et al.*,1968). Hirisan yang didapati daripada bahagian yang lebih jauh jaraknya dari bahagian apeks sesuatu sulur menghasilkan kalus yang lebih baik daripada yang berdekatan dengan apeks. Pembentukan pucuk dipertingkatkan dengan menambahkan 50 mg. adenina sulfat. Kesemua anak benih yang didapati daripada kalus ini adalah diploid walaupun terdapat perubahan ploidi diperhatikan dalam tisu kalus.

Tingkat ploidi pokok asparagus yang dibiakkan dengan keratan akar dan kultur kalus telah dibandingkan (Malnassy dan Ellison,1970) . Didapati lebih banyak anak benih yang diperolehi dari kultur kalus adalah tetraploid berbanding dengan yang didapati dari keratan akar.

Menggantikan 2,4-D dengan NAA, terutamanya kombinasi dengan BA menghasilkan lebih banyak penjanaan semula pucuk dan akar dari kalus yang didapati dari kalus eksplan tisu kabus (Yakuwa *et al.*, 1971a,b). Kepekatan optimum BA dan NAA diantara 0.1 dan 1.0 $mg.l^{-1}$ mengurangkan pengeluaran anak benih. Hunault (1975) melaporkan pengaruh medium asas yang ketara ke atas proliferasi kalus. Misalnya LS yang diperkayakan dengan ion-ion thiamina, nitrat dan ammonium dibuktikan paling berkesan dibandingkan dengan enam medium dasar yang lain. Harada (1973) menerangkan kesan pelbagai auksin, sitokinin dan kasein hidrolisat ke atas gerakbalas morfogenetik eksplan batang asparagus di atas medium MS bagi pembentukan kalus, akar, pucuk dan embrio somatik. Pertumbuhan kalus lebih diransangkan oleh 0.5 - 5.4 μM NAA dari 2,4-D; dimana zeatin, BA dan kinetin mempunyai keaktifan yang sama. Akar adventitus yang terbentuk adalah lebih sedikit dengan 5.4 μM NAA berbanding dengan 2,4-D. Kesan perencatan ke atas pengakaran adalah tertinggi dengan 0.05 μM kinetin, sederhana dengan BA, dan terendah dengan zeatin. Penjanaan semula anak benih daripada tisu kalus adalah lebih baik dengan menggunakan kombinasi 0.5 μM NAA dengan 4.6 μM zeatin sementara BA dan kinetin adalah kurang berkesan. Kasein hidrolisat hanya meransang pembentukan pucuk.

Kajian histologi keratan batang ketika pengaruhan kalus disebabkan oleh 2,4-D dalam cahaya mendedahkan bahawa kalus bermula dari subepidermal kambium yang meresap dengan beberapa trakeid (Hunault, 1973). Perkembangan selanjutnya kultur kalus menghasilkan pembentukan sebilangan akar-akar daripada permukaan kalus. Tetapi akar-akar mempunyai morfologi atrofi. Kecacatan akar-akar adventitus digalakkan oleh 2,4-D dan juga oleh NAA pada kes-kes tertentu , bertanggungjawab ke atas kematian anak benih *in vitro* apabila dipindahkan ke tanah. Akar-akar atrofi merosot dalam tanah dan tidak dapat mengekalkan keupayaan menyimpan air dan penyerapan bekalan nutrien.

Bagi meningkatkan kadar penggandaan dari kultur kalus dan mendapatkan pembezaan organ tanpa menyebabkan penyimpangan dari segi morfologi dan kekusutan pada fungsi, prosedur pembiakan telah dibahagikan kepada dua langkah yang berbeza (Reuther, 1977a,b,1978,1979). Apeks pucuk dan apeks lateral yang dipotong dari asparagus hijau dan putih telah dikultur ke atas medium dasar LS pepejal yang ditambah dengan 5.4 μM IAA dan 4.6 - 9.3 μM kinetin. Fasa proliferasi bermula hanya selepas subkultur. Selepas pembentukan kalus dan proliferasi, gumpalan kalus dipindahkan kepada medium dasar yang sama dengan ditambah 5.7 μM IAA dan 0.4 - 4.4 μM BA atau 0.5 - 4.9 μM 2ip. Sebahagian besar gumpalan kalus terlebih dahulu membentuk pucuk atau dengan serentak membentuk pucuk dan juga akar, tetapi pembentukan akar secara berasingan tidak kelihatan. Pucuk yang terbentuk dari kalus berakar dengan cepat jika dikulturkan di

atas medium LS dengan ditambahkan 2.9 μm IAA. Menggantikan NAA dengan IAA mengurangkan kecenderungan pengakaran dan permulaan pembezaan pucuk.

2.7 Morfologi biji benih dan kecergasan tanaman

Saiz biji benih selalu dikaitkan dengan kecergasan pertumbuhan pokok. Scheer *et al.* (1959) dalam satu kajian yang dijalankannya telah menggolongkankan berat biji benih Asparagus kepada 3 kelas, iaitu, berat, sederhana dan ringan dimana beliau dapati biji benih yang berat lebih tinggi percambahannya berbanding biji benih yang ringan.

Taylor dan Ten Broeck (1988) melaporkan bahawa daya percambahan biji benih bertambah secara langsung dengan besarnya saiz. Walaubagaimanapun , Bremner *et al.* (1963) yang menjalankan kajiannya ke atas biji benih gandum mendapati bahawa biji benih yang kecil menggunakan simpanan makanan dengan lebih efisen dibandingkan dengan biji benih yang besar. Mereka membuat kesimpulan bahawa jumlah simpanan makanan yang tersedia pada anak benih yang sedang membesar adalah satu faktor dominan dalam menentukan keupayaan daya percambahan. Mereka juga menyatakan bahawa saiz embrio tidak memberikan kesan yang signifikan kepada pertumbuhan keseluruhannya tetapi sebaliknya saiz endosperm yang sebenarnya memberikan kesan pertumbuhan keseluruhannya kepada tanaman.

Corak pertumbuhan anak benih adalah penting bagi menentukan sesuatu spesis tanaman mencapai pertumbuhan yang baik. Qiu *et al.* (1994) yang melakukan kajian ke atas tanaman Vetch (*Vicia sativa* L.) mendapati anak benih

yang berasal dari biji benih yang berat menggunakan simpanan makanan pada kadar yang lebih cepat. Walaubagaimanapun efisiensi penukaran simpanan makan kotiledon adalah sama tidak mengira samaada biji benih itu besar atau kecil. Oleh yang demikian kelebihan biji benih yang besar terletak kepada kandungan simpanan makanannya dalam kotiledon . Oleh itu ia lebih berupaya menyediakan tenaga yang lebih cepat untuk pembesaran anak benih. Biji benih yang berat juga mempunyai kadar pemanjangan , timbunan permukaan daun dan pucuk, serta berat kering daun dan akar yang lebih tinggi dibandingkan dengan biji benih yang ringan. Oleh yang demikian biji benih yang berat menghasilkan anak benih yang mempunyai keupayaan pertumbuhan yang tinggi.

Pertumbuhan anak benih boleh dibahagikan kepada tiga peringkat berasaskan pergantungan tenaganya iaitu:

i. Heterotropik dimana simpanan makanan biji benih satu-satunya sumber tenaga.

ii. Peringkat peralihan di antara heterotropik dan autotropik.

iii. Autotropik, iaitu, apabila simpanan makanan biji benih kehabisan dan fotosintesis menjadi satu-satunya sumber tenaga (Cooper, 1967).

Cooper dan MacDonald (1970) melaporkan penggunaan endosperm dalam jagung (Zea mays, L.) bagi pertumbuhan anak benih hingga ke peringkat dua helai daun di bawah cahaya atau tidak adalah sama . Harris et al. (1986) mendapati cahaya tidak mendatangkan kesan pada penggunaan simpanan makanan biji benih pada tanaman kacang soya (*Glycine max* (L.) Merr.).