

PENJANAAN VARIAN GENETIK TANAMAN ROSEL (*Hibiscus  
sabdariffa* L.) MELALUI KACUKAN BUATAN  
DAN KULTUR DEBUNGA

ROHAYU BINTI MA'ARUP

TESIS YANG DIKEMUKAKAN UNTUK MEMPEROLEH IJAZAH  
SARJANA SAINS

FAKULTI SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITI KEBANGSAAN MALAYSIA

BANGI

2012





## PENGAKUAN

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

24 Mei 2012



ROHAYU BINTI MA'ARUP  
P52756

## PENGHARGAAN

Dengan nama Allah yang maha pengasih lagi Maha penyayang.

Alhamdulillah, terlebih dahulu bersyukur saya ke hadrat allah kerana dengan limpah kurnia-Nya dapatlah saya menyiapkan projek penyelidikan ilmiah ini. Pertama sekali saya ingin mengucapkan setinggi-tinggi penghargaan kepada Prof. Dr. Mohamad Osman (UIAM), Prof Dr. Zubaid Akbar Mukhtar Ahmad (UKM) selaku penyelia saya dan Prof. Madya Dr. Maheran Abdul Aziz (UPM) selaku penyelia bersama bagi projek penyelidikan ini. Terima kasih diucapkan kerana sepanjang projek penyelidikan ini kerana telah memberikan panduan, tunjuk ajar, dorongan dan nasihat yang tidak berbelah bahagi.

Di samping itu, tidak dilupakan juga kepada mereka yang lain yang turut membantu saya dalam menjayakan projek penyelidikan ini. Jutaan terima kasih yang tidak terhingga juga kepada Yap Jing Wei dan Prof Mahani Mansor Clyde yang memberi tunjuk ajar kepada saya bagi analisis sitometri aliran. Tidak dilupa juga En. Zainal dan kakitangan Rumah Tumbuhan UKM seperti En. Ayub Razak, En. Abdul Aziz Suki, En. Mohd Sani, En. Sahar Hassan, dan En. Hari Krishnan.

Kepada suami, keluarga, teman-teman seperjuangan yang sering mendoakan, memberikan kata-kata semangat dan perangsang, terima kasih kepada kalian dan semoga kejayaan milik kita bersama. Moga allah merahmatimu selalu.

## ABSTRAK

Tanaman rosol mempunyai bilangan aksesi germplasma yang terhad bagi kajian pembiakbakaan rosol. Oleh itu, dalam kajian ini terdapat dua kaedah yang digunakan dan dikenalpasti berpotensi bagi mendapatkan variasi genetik baru pada rosol. Kaedah pertama ialah melalui kacukan buatan dan kaedah kedua pula melalui kultur debunga. Aksesi 21 beserta 3 titisan mutannya iaitu UKMR-1, UKMR-2 dan UKMR-3 merupakan bahan kajian bagi menjana variasi genetik baru pada rosol. Bagi kaedah pertama, pembangunan kaedah pengembirian dan kacukan berjaya dilakukan pada rosol. Walau bagaimanapun, melalui kacukan buatan (UKMR-3 x UKMR-2), rosol hibrid tidak diperolehi daripada enam buah yang matang. Bagi kaedah kedua pula, pembangunan kultur debunga pada rosol telah dapat menghasilkan kadar regenerasi hingga 80% serta tinggi bilangan pucuk haploid yang mempunyai kromosom berganda. Kultur debunga bermula dengan pengenalanpastian bilangan nukleus pada debunga sebelum dikultur. Pra-rawatan pada debunga yang dikenakan sebaik sahaja dikultur di atas media pada suhu 4 °C, 35 °C, dan tanpa prarawatan sebagai kawalan menunjukkan tindak balas yang signifikan ( $P \leq 0.05$ ). Induksi kalus berlaku dengan baik apabila diinkubasi di bilik kultur pada tempat yang gelap selama 8 minggu. Media Murashige dan Skoog (MS) yang terubah memberikan hasil yang paling baik bagi induksi kalus berbanding media Driver and Kuniyuki walnut (DKW), Gamborg B5 dan McCown. Kombinasi benzilaminopurin (BA) bersama 2,4-diklorofenoksi asetik (2,4-D) pada kepekatan 5 $\mu$ M menghasilkan 100% pengaruhan kalus. Walaupun begitu, 80% kadar regenerasi pucuk terhasil daripada kalus yang embriogenik hasil daripada debunga yang diaruhkan pada rawatan 10  $\mu$ M naphthalene asetik (NAA). Kalus yang bersaiz 2 mm dipindahkan ke separuh MS media yang mengandungi 1.71  $\mu$ M indol-3-asetik (IAA) bersama 1.37  $\mu$ M zeatin dan didedahkan pada 16 jam cahaya di dalam bilik kultur bagi proses pembahagian. Penambahan 100 ml/L air kelapa di dalam MS media mengandungi 4.56  $\mu$ M zeatin merangsang regenerasi kalus menjadi pucuk dalam tempoh sebulan setengah berbanding tanpa air kelapa yang mengambil masa tiga bulan. Akar berjaya diinduksikan pada media MS yang mengandungi 19.69  $\mu$ M Indol-3-butirik asetik (IBA) untuk 3 hari diikuti pemindahannya pada media MS tanpa rawatan selama satu minggu. Tiga puluh pucuk yang diregenerasi daripada kalus debunga diuji tahap ploidi dengan menggunakan sitometri aliran bersama propidium iodide dan hanya satu dikenalpasti sebagai haploid. Variasi genetik dikenalpasti dengan menggunakan penanda DNA universal M13 (5'-TTATGAAACGACGGCCAGT-3') melalui tindak balas berantai polimerase. Empat jalur polimorfisma pada lokus (M13-01, M13-03, M13-04, dan M13-06) dikenalpasti pada pucuk haploid apabila dibandingkan dengan penderma debunga. Pucuk haploid ini juga mempunyai corak jalur yang berbeza apabila dibandingkan dengan varieti rosol lain yang dikaji. Ini membuktikan variasi genetik dapat dijana melalui kultur debunga. Pucuk haploid ini dirawat selama (tiga hingga enam jam) dengan 0.025% dan 0.05% kolkisin bagi menggandakan kromosomnya. Pucuk haploid yang dirawat ini tidak dapat terus hidup selepas seminggu dikultur di dalam media regenerasi pucuk.

## DEVELOPMENT OF NEW GENETIC VARIANTS THROUGH CONVENTIONAL HYBRIDIZATION AND POLLEN CULTURE IN ROSELLE (*Hibiscus sabdariffa* L.)

### ABSTRACT

Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) has limited number of germplasm accessions available for breeding. Thus, attempts to obtain new variants of roselle through conventional hybridization and pollen culture were the relevance options for this research. Accession 21 (Arab) and its mutant lines UKMR-1, UKMR-2, UKMR-3 were used as plant materials in this research. In conventional hybridization research, emasculation and crossing method were developed. Unfortunately, new variants were not obtained from six matured fruit derived from UKMR-3 x UKMR-2. In pollen culture research, resulted 80% efficiency in plant regeneration and also doubled haploid induction. Pollens culture started with identification of buds with anthers containing pollens at the early to late-uninucleate. Pretreatment of the buds at 4 °C, 35 °C and without pretreatment showed significant results for pollen derived callus ( $P \leq 0.05$ ). The best response of pollen derived callus was obtained when the pollen cultures were incubated in darkness for 8 weeks. Modified Murashige and Skoog (MS) medium were more effective than Driver and Kuniyuki walnut (DKW), Gamborg's B5 and McCown's media for the callus induction. The combination of benzyladenine (BA) with 2,4-dichloro-phenoxyacetic acid (2,4-D) at 5 $\mu$ M produced 100% pollen derived callus. Nevertheless, calluses at 10  $\mu$ M of naphthaleneacetic acid (NAA) have been identified embryogenic and 80% shoots were regenerated from its. A callus (2 mm in size) was transferred to half MS medium containing 1.71  $\mu$ M indole-3-acetic acid (IAA) and 1.37  $\mu$ M zeatin and placed under 16 hour photoperiod for multiplication. The inclusion of 100 ml/L coconut water in MS medium containing 4.56  $\mu$ M zeatin enhanced faster callus regeneration from three months to one and a half month. Shoots were successfully rooted upon transfer into MS medium containing 19.69  $\mu$ M Indole-3-butyric acid (IBA) for 3 days followed by transfer into MS medium for one week. Thirty regenerated plants were tested and only one was detected as haploid by using flow cytometry combined with propidium iodide. Genetic variation was identified using the universal DNA marker M13 (5' TTATGAAACGACGGCCAGT-3') through polymerase chain reaction (PCR). Four polymorphic bands at loci M13-01, M13-03, M13-04, and M13-06 were obtained in haploid shoots but not in pollen grain donor plant. The new variants obtained also differed from investigated varieties. This proved that genetic variants could be generated through pollen culture. Haploid shoots were exposed for three to six hours with 0.025% and 0.05% colchicines for chromosome doubling. Unfortunately, colchicine-treated haploid shoots failed to survive after one week of cultured on shoot regeneration medium. To our knowledge, this is the first report on generated haploid plant in roselle for new genetic variants development.