

## PERKEMBANGAN PENGGUNAAN KULTUR *IN VITRO* DALAM PERBANYAKAN DAN PEMULIAAN TANAMAN KARET

### *DEVELOPMENT OF IN VITRO CULTURE FOR PROPAGATION AND RUBBER PLANT BREEDING*

Meynarti Sari Dewi Ibrahim

**Balai Penelitian Tanaman Industri dan Penyegar**  
Jl. Raya Pakuwon – Parungkuda km. 2 Sukabumi, 43357  
Telp. (0266) 6542181, Faks. (0266) 6542087  
*meynartisaya@yahoo.com*

#### ABSTRAK

Tanaman karet (*Hevea brasiliensis* Muell Arg) umumnya diperbanyak menggunakan okulasi. Beberapa kelemahan yang ditemukan dalam perbanyakan ini mengakibatkan perbanyakan karet secara massal belum dapat dilakukan. Penggunaan teknik kultur *in vitro* melalui multiplikasi tunas (organogenesis) maupun embriogenesis somatik pada tanaman karet diharapkan dapat mengatasi kendala tersebut. Embriogenesis somatik memberi peluang untuk perbanyakan bibit karet secara massal dalam waktu cepat dan efisien. Selain untuk perbanyakan, teknik ini juga digunakan pemulia dalam mempercepat proses pemuliaan tanaman menghasilkan varietas unggul baru tanaman karet. Penggunaan kultur anther, fusi proplas, dan rekayasa genetik merupakan metode pemuliaan yang telah dimanfaatkan dalam pemuliaan tanaman karet. Tulisan ini bertujuan memberikan informasi bagi peneliti dalam memahami penelitian yang telah dilakukan pada tanaman karet, sehingga penelitian lanjutan untuk program pemuliaan tanaman dapat lebih mudah dilakukan.

Kata kunci: *Havea brasiliensis* Muell Arg, organogenesis, embriogenesis somatik, perbaikan genetik, varietas unggul

#### ABSTRACT

*Rubber plant (Hevea brasiliensis Muell Arg) is generally propagated through grafting. However, it is not ideal for massive multiplication. In vitro culture techniques through shoots multiplication (organogenesis) and somatic embryogenesis is considered as more suitable. Somatic embryogenesis enables mass propagation efficiently. Breeders also use the technique to accelerate the breeding process in generating new superior varieties. Anther culture, fusion proplas, and genetic engineering are breeding methods that have been utilized in rubber plant breeding. This paper aims to provide information for researchers in understanding researches that have been done on rubber plants which will be beneficial for further studies.*

*Key words: Havea brasiliensis, genetic improvement, organogenesis, somatic embryogenesis, superior varieties*

#### PENDAHULUAN

Karet (*Hevea brasiliensis* Muell Arg), merupakan tanaman yang mempunyai nilai ekonomi karena dapat menghasilkan karet alami. Getah atau lateks dari tanaman karet dimanfaatkan sebagai bahan utama industri, seperti peralatan memasak, medis, rumah tangga, dan transportasi. Perkembangan teknologi dan industri yang semakin berkembang menyebabkan penggunaan karet alam semakin luas. Sebagai negara pengekspor karet alam kedua terbesar di dunia setelah Thailand, Indonesia memiliki peluang besar

dalam peningkatan hasil produktivitas tanaman karet (Sari & Supijatno, 2015).

Penggunaan benih unggul merupakan kendala yang harus diperhatikan dalam meningkatkan produktivitas karet Indonesia. Penyediaan benih unggul secara konvensional oleh pemulia tidak bisa dilakukan secara massal karena keterbatasan dalam sistem perbanyakannya. Tanaman karet umumnya diperbanyak melalui okulasi, sehingga untuk menghasilkan bibit yang berkualitas perlu mempersiapkan adanya batang atas dan batang bawah. Batang bawah berupa tanaman semaian dan biji klon anjuran, sedangkan batang atasnya

berasal dari mata klon-klon anjuran (Haryanto, 2012).

Perbanyakan tanaman karet menggunakan teknik okulasi mempunyai beberapa kelemahan diantaranya memerlukan waktu yang lama ( $\pm$  18 bulan sejak berkecambah sampai pindah tanam), membutuhkan lahan yang luas, musim biji yang terbatas, dan tenaga kerja yang banyak (Admojo, Indrianto, & Hadi, 2014). Selain kelemahan tersebut, adanya variasi hasil pohon di perkebunan karet juga dikaitkan dengan bahan batang bawah yang heterozigot. Hal ini tidak lain karena tanaman karet merupakan tanaman yang menyerbuk silang, sehingga biji yang dihasilkan tentunya akan beragam. Interaksi antar batang atas dan batang bawah yang beragam dapat memengaruhi hasil lateks pohon karet. Kelemahan tersebut sering menjadi kendala untuk memproduksi bibit tanaman karet skala massal.

Permasalahan tersebut mengharuskan penelitian diarahkan pada perbanyakan bibit dengan teknik yang lebih efisien dalam skala massal. Perbanyakan massal dapat ditempuh dengan menggunakan teknik kultur *in vitro*. Perbanyakan menggunakan teknik kultur *in vitro* pada tanaman karet telah dilaporkan melalui multiplikasi tunas (organogenesis) dan embriogenesis somatik.

Selain memperbanyak tanaman, kultur *in vitro* juga digunakan dalam memperbaiki genetik tanaman untuk mendapatkan varietas unggul baru karet. Perbaikan genetik tanaman karet menggunakan cara non konvensional dapat terlaksana jika teknik kultur *in vitro* terutama melalui embriogenesis somatik dapat dikuasai dengan baik. Tulisan ini merangkum bagaimana perkembangan penelitian kultur *in vitro* dan penggunaannya dalam perbanyakan dan pemuliaan tanaman karet. Dengan memahami perkembangan penelitian kultur *in vitro* pada tanaman karet, diharapkan pekerjaan penelitian lanjutan untuk program pemuliaan tanaman dapat lebih mudah dilakukan.

## PERKEMBANGAN PENELITIAN KULTUR *IN VITRO* PADA TANAMAN KARET

### Multiplikasi Tunas (Organogenesis)

Penggunaan benih unggul hasil perbanyakan menggunakan teknik kultur *in vitro*, telah menjadi tujuan utama untuk tanaman karet dalam rentang waktu 60 tahun kebelakang. Penelitian kultur *in vitro* tanaman karet pertama kali dilaporkan pada tahun 1953 oleh Bouychou dari Institute Francais Caoutchouc, kemudian tahun 1996 disusul oleh Chua yang merupakan peneliti Rubber Research Institute of Malaysia (Wilson & Street, 1975).

Pada awalnya perbanyakan tanaman karet dilaporkan menggunakan eksplan yang berbeda, namun sebagian besar berasal diambil pada fase bibit. Eksplan yang menggunakan klon unggul karet yang telah dewasa (pohon) sangat sulit dikulturkan. Hanya beberapa penelitian yang berhasil menggunakan eksplan dari tanaman dewasa, itupun dengan keberhasilan rendah. Masalah utama yang ditemukan ketika menggunakan eksplan dari pohon dewasa adalah kegagalan dalam menghasilkan akar yang memadai (Carron & Enjarlic, 1983), pertumbuhan dan perkembangan yang lambat dan daya multiplikasinya sangat rendah (Seneviratne, 1991).

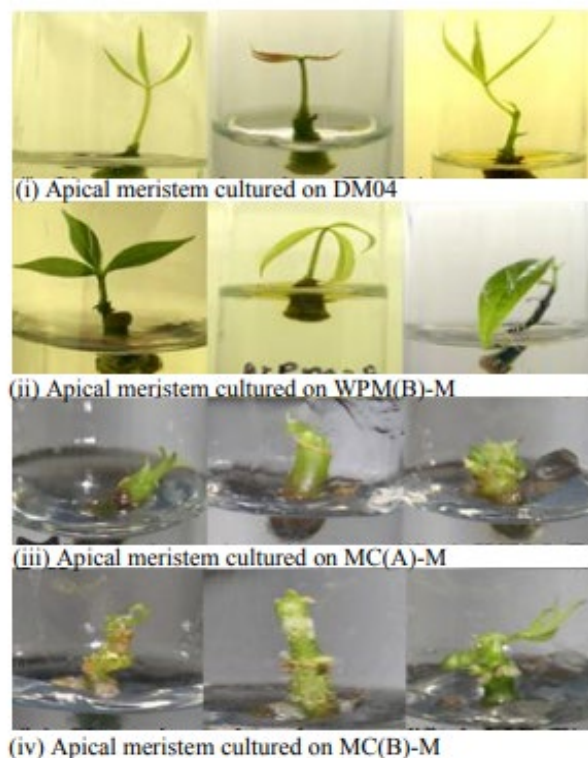
Kontaminasi oleh jamur dan bakteri juga merupakan hambatan utama dari eksplan yang diambil dari tanaman dewasa berasal dari lapangan. Kontaminasi sering menjadi permasalahan pada kultur *in vitro* pada pertanaman di daerah beriklim tropis. Untuk mendapatkan metode sterilisasi yang efektif pada tanaman karet, beberapa peneliti melakukan penelitian yang difokuskan pada teknik sterilisasi (Seneviratne, 1991).

Kultur *in vitro* menunjukkan hasil menjanjikan dalam peningkatan perbanyakan tunas dari multiplikasi tunas mikro karet, walaupun belum menghasilkan tunas dan akar pada waktu yang bersamaan. Penelitian Enjarlic & Carron (1982) menggunakan eksplan tunas yang berasal dari bibit berumur 1-3 tahun di rumah kaca, menghasilkan planlet yang dapat

berakar. Planlet bertunas dan akar juga berhasil dikembangkan oleh Gunatilleke & Samaranyake (1988), Carron, Enjalric, Lardet, & Deschamps (1989), Sompong & Muangkaewngam (1992), serta Seneviratne & Flegmann (1996). Eksplan yang diremajakan dengan teknik *micrografting* telah dilakukan oleh Perrin, Lardet, Enjalric, & Carron (1994), sementara tunas dari eksplan nodal yang diambil dari cabang aktif menunjukkan respon *in vitro* yang lebih baik (Seneviratne & Wijesekara, 1997; Lardet, Aguilar, Michaux-Fermere, & Berthouly, 1998).

Sistem perakaran yang sulit berhasil diatasi oleh penelitian Kala *et al.* (2002). Penelitian perbanyakan multiplikasi tunas menunjukkan

hasil yang mengembirakan setelah Edusuriya (2004) dan Jayatillake (2007) berhasil memultiplikasi tunas dan perakaran yang lebih baik. Penggunaan eksplan meristem untuk mengeleminasi penyebaran virus lewat benih dan memperbaiki pola perakaran juga telah berhasil dilakukan oleh Mayati & Jamnah (2014). Kultur karet dari eksplan yang berupa akar adventif dan pembentukan tunas diinduksi dari meristem lateral dan meristem apikal pada beberapa media dasar memperlihatkan hasil yang berbeda (Mayati & Jamnah, 2014) (Gambar 1). Terlepas dari upaya ini selama beberapa tahun, belum ada teknik yang dapat diandalkan untuk perbanyakan karet skala massal secara komersial.



Gambar 1. Regenerasi tunas adventif dan multiplikasi dari meristem apikal tunas Hevea RRIM 2020 ketika diuji pada empat media yang berbeda yaitu: (i) DM04, (ii) WPM (B), (iii) MC (A)-M, dan (iv) MC (B) -M (Sumber: Mayati & Jamnah, 2014).

Figure 1. Adventitious shoots regeneration and multiplication of apical shoot meristem of Hevea RRIM 2020 tested in different media, i.e. (i) DM04, (ii) WPM (B), (iii) MC (A)-M, and (iv) MC(B)-M (Source: Mayati & Jamnah, 2014).

Di dalam negeri perkembangan penelitian kultur karet melalui multiplikasi tunas belum sebaik di luar negeri. Rendahnya daya

multiplikasi dan perakaran merupakan hal yang masih perlu diteliti lebih lanjut. Nurhaimi-Haris, Sumaryono, & Carron (2009)

melaporkan bahwa keberhasilan tahap kultur awal sebesar 60%, dimana laju multiplikasi per siklus subkultur 1,2–1,5 kali, dan keberhasilan tahap aklimatisasi 20%-60%. Rendahnya daya multiplikasi coba diatasi dengan memperbanyak tunas steril. Beberapa penelitian seperti Harahap, Siregar, & Husni (2014) menambahkan BAP 1 ppm pada media MS untuk memultiplikasi tunas sementara Sundari, Siregar & Hanafia (2014) memberikan BAP 0,5 ppm + NAA 0,25 ppm pada media WPM. Sampai saat ini penelitian masih terus dilakukan untuk mendapatkan metode yang efisien. Akar adventif dan pembentukan tunas diinduksi dari meristem lateral dan apikal.

### Embriogenesis Somatik pada Karet

Regenerasi melalui embriogenesis somatik sangat diperlukan bagi perbanyakan, dan perbaikan genetik tanaman karet. Meskipun perbanyakan klon karet menggunakan proliferasi tunas aksilar telah mencapai tingkat yang menjanjikan, ada sejumlah kelemahan dalam sistem ini. Kelemahannya antara lain jumlah tunas yang dihasilkan dari sistem multiplikasi planlet masih belum dapat digunakan untuk perbanyakan skala massal dan tidak memiliki akar tunjang.

Upaya untuk mengembangkan embriogenesis somatik sebagai teknik perbanyakan *in vitro* dimulai pada awal 1970-an oleh peneliti dari Cina dari *Rubber Cultivation Research Institute* (Baodao), dan peneliti Malaysia dari *Rubber Research Institute of Malaysia*, sementara peneliti dari *Institute de Recherche sur le Caoutchouc* (Prancis) mulai bekerja di bidang ini pada tahun 1979 (Carron, 1980). Di Srilangka walaupun telah memulai menginisiasi induksi kalus dari anther pada tahun 1972, namun penelitian yang mengarah kepada embriogenesis somatik dilakukan pada tahun 1984 (Anon, 1984).

Pada tahun 1974, Paranjothy merupakan peneliti pertama melaporkan embriogenesis somatik karet dari kalus yang berasal dari dinding anter, namun tidak dapat beregenerasi. Embriogenesis somatik baru dapat beregenerasi setelah Paranjothy dan Rohani melakukan penelitian lanjutan. Sejak saat itu, kultur *in vitro*

karet dapat dilakukan dari dinding antera (Wang *et al.* 1980).

Wang & Chen (1995) telah melakukan upaya regenerasi planlet melalui embriogenesis somatik dari kultur benang sari. Optimalisasi suhu untuk induksi kalus, embriogenesis somatik, dan regenerasi planlet dapat meningkatkan frekuensi regenerasi hingga 40,5% (Wang, Wu, & Chen, 1998). Terlepas dari semua studi di atas, frekuensi regenerasi tanaman tetap masih rendah dan teknologi ini belum dapat mencapai skala komersial. Sebagian besar penelitian menggunakan jaringan integumen bagian dalam sebagai eksplan. Dilaporkan bahwa kalus yang diperoleh dari integumen biji belum sempurna sering ditampilkan berwarna kecoklatan (nekrosis) yang mengarah ke degenerasi jaringan dan hilangnya kompetensi embriogenik (Housti, Coupe, & d' Auzac, 1991; Veisseire, Linossier, & Coudret, 1994).

Jayasree *et al.* (1999) melaporkan protokol standar untuk induksi kalus embriogenik, embriogenesis somatik, dan regenerasi pada karet. Induksi kalus optimal diperoleh pada MS termodifikasi yang dilengkapi dengan kinetin 0,5 mg/l dan 2,4-D 2,0 mg/l. Induksi embrio somatik ditemukan lebih baik dengan kinetin 0,7 mg/l dan NAA 0,2 mg/. Pengembangan lebih lanjut dari embrio menjadi planlet dicapai pada media tanpa zat pengatur tumbuh. Hasil analisis sitologi memperlihatkan bahwa semua planlet yang dihasilkan adalah diploid.

Bunga yang masih kuncup (fase sebelum mikrosporogenesis) telah diidentifikasi sebagai sumber eksplan yang cocok dikembangkan untuk induksi embrio somatik dan regenerasi tanaman untuk klon RRII-105, yang merupakan klon populer di India. Kandungan sukrosa yang lebih tinggi didapatkan lebih efektif untuk menginduksi embrio dan pematangan embrio. Namun, kadar yang lebih rendah cocok untuk media regenerasi (Sushamakumari, Sobha, Rekha, Jayasree, & Asokan, 2000).

Penelitian tentang kebutuhan asam giberelin pada induksi dan pematangan embrio mengungkapkan bahwa penambahan GA3 hingga 2,0 mg/l meningkatkan frekuensi induksi embrio. Persentase perkecambahan juga

meningkat secara signifikan dengan konsentrasi yang lebih tinggi. Namun pengembangan tanaman lebih lanjut dipengaruhi oleh peningkatan kadar GA3 (Jayasree & Thulaseedharan, 2001).

Embriogenesis sekunder juga diinduksi dari embrio somatik primer yang berasal dari jaringan integral. Optimasi embrio somatik dilakukan dengan mengkultur embrio somatik primer pada media B-5 yang dilengkapi dengan NAA 0,5 mg/l; kinetin 2,0 mg/l; IAA 0,5 mg/l; dan 2,4-D 4,0 mg/l dengan penambahan sukrosa 5% (Asokan, Sobhana, Sushamakumari, & Sethuraj, 1988). Kultur embriogenik telah disimpan selama lebih dari tiga tahun untuk melihat potensi induksi embrio dan regenerasi tanaman (Jayasree & Thulaseedharan, 2004). Hasilnya memperlihatkan bahwa daya regenerasi kalus terlihat menurun seiring dengan bertambah lamanya proses penyimpanan.

Para peneliti di *International Centre on Agriculture Research for Development* (CIRAD) membagi embriogenesis somatik atas embriogenesis somatik primer, pemeliharaan

embrio somatik, dan embriogenesis somatik sekunder. Secara keseluruhan embriogenesis dibagi dalam 5 tahapan, yaitu: induksi kalus, induksi embrio, pengembangan embrio, maturasi, dan regenerasi embrio menjadi planlet. Eksplan yang digunakan berupa integumen (Bintarti, 2015). Untuk induksi kalus media dasar menggunakan media yang dikembangkan oleh Carron, Enjalric, Lardet, & Deschamps, (1989). Saat ini telah banyak hasil embriogenesis somatik karet yang telah ditanam dilapang. Sejumlah laporan menyatakan klon unggul tumbuh lebih cepat dan menghasilkan lateks lebih banyak saat ditumbuhkan dengan perakaran sendiri (*Self-rooted plants*) dibandingkan dari bibit hasil sambungan (okulasi) (Montoro, Carron, Granet, Lardet, & Leclercq, 2012). Penelitian Piyatrakul *et al.* (2012) telah berhasil mengembangkan metode embrio somatik pada bioreaktor dengan sistem perendaman sesaat (Gambar 2). Berbagai percobaan lapangan juga telah dilakukan di berbagai negara seperti Nigeria, Thailand, dan Pantai Gading.



Gambar 2. Morfologi dari berbagai tipe kalus dan perkembangan embrio somatik karet: (A) sumber eksplan berupa integumen dari bagian dalam biji (skala bar = 5 mm), (B) kalus kompak pada media embrio somatik dari embriogenesis somatik

primer (bar = 5 mm), (C) kalus embriogenik dan struktur pro-embrio (panah putih) pada media pengembangan embrio somatik (bar = 5 mm), (D) perkembangan regenerasi kalus pada media embriogenesis (ENT) (bar = 1 mm). (E) Kalus embriogenik, (F) kalus yang beregenerasi pada TIS, (G) plantlet dari embrio somatik (bar = 10 mm), (H) Regenerasi embriogenik dan tidak, (I) kalus embriogenik yang mampu beregenerasi di TIS, (J) ekspresi regenerasi non embriogenik dalam media (K) kalus non embriogenik di TIS (bar = 10 mm). (Sumber: Piyatrakul *et al.*, 2012).

**Figure 2.** *Morphology of various stage of callus and somatic embryo development: (A) explants taken from integumen of the rubber seed (bar scale = 5 mm), (B) compact callus in somatic embryo from primary somatic embryogenesis (bar scale = 5 mm), (C) embryogenic callus and pro-embryogenic structure (white arrow) on somatic embryo growth media (scale bar = 5 mm), (D) callus development on embryogenesis media (bar = 1 mm), (E) embryogenic callus, (F) callus regenerated at TIS, (G) somatic embryo plantlets (bar = 10 mm), (H) embryogenic regenerants and non embryogenic, (I) embryogenic regenerant and non embryogenic at TIS (bar = 10 mm), (J) non embryogenic expression on media, (K) non embryogenic callus in TIS (Source: Piyatrakul et al., 2012).*

Embriogenesis somatik sekunder memungkinkan untuk menghasilkan jumlah embrio yang tidak terbatas. Embrio somatik sekunder berulang telah dilaporkan oleh Hua *et al.* (2010). Kotiledon dari embrio somatik primer dipotong-potong dengan ukuran 3,0 mm × 3,0 mm dan digunakan sebagai eksplan untuk menginduksi embriogenesis sekunder. Meskipun masing-masing potongan menghasilkan tidak lebih dari 0,67 embrio somatik fase kotiledon, faktor multiplikasi umumnya lebih tinggi dari 10 pada setiap siklus. Sampai saat ini, rendahnya jumlah plantlet yang terbentuk dari embrio somatik masih tetap menjadi pembatas dalam mengaplikasikan metode ini menjadi pada industri skala besar.

Di Indonesia sendiri teknik embriogenesis somatik pada tanaman karet telah dimulai pada tahun 1990-an. Penelitian yang dilakukan oleh pusat penelitian karet dan Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia telah berhasil mendapatkan plantlet karet, namun tingkat keberhasilannya masih sangat rendah (<10%) (Darajat & Pararibu, 2015). Penelitian embriogenesis somatik di dalam negeri masih terus diteliti dan dikembangkan keberadaannya agar didapatkan hasil yang optimal.

Berdasarkan penelitian berkelanjutan dapat dilihat bahwa embriogenesis somatik pada karet sangat dipengaruhi oleh genotipe dan interaksi genotipe-lingkungan. Ketidaksiharian dalam perkecambahan dan konversi embrio menjadi plantlet yang sangat rendah (Carron *et al.*, 1995), sehingga Linossier, Veisseire, Cailloux, & Coudret (1997) mengharuskan untuk mengoptimalkan kondisi kultur untuk setiap genotipe karet. Banyak faktor yang memberikan pengaruh penting terhadap pembentukan embriogenesis somatik diantaranya : jenis eksplan, jumlah zat pengatur tumbuh dan zat penambah pertumbuhan lainnya, komposisi media dasar, intensitas dan cahaya. Sehingga pembentukan embrio somatik yang dapat diandalkan masih terbatas hanya pada beberapa genotipe karet unggul (Montoro, Carron, Granet, Lardet, & Leclercq, 2012; Shiji, Zherghua, & Xueng, 1990).

#### **APLIKASI PENGGUNAAN KULTUR *IN VITRO* DALAM PEMULIAAN TANAMAN KARET**

Pemuliaan konvensional pada tanaman karet agak sulit karena merupakan tanaman tahunan yang sifatnya menyerbuk silang (heterozigot). Penggunaan teknik kultur *in vitro*

pada tanaman karet diharapkan dapat mendukung program pemuliaan untuk mendapatkan klon-klon unggul baru dengan cara yang lebih cepat. Beberapa teknik yang dilaporkan mengaplikasikan penggunaan kultur *in vitro* dalam prose pemuliaan tanaman karet adalah sebagai berikut:

#### Kultur Anther

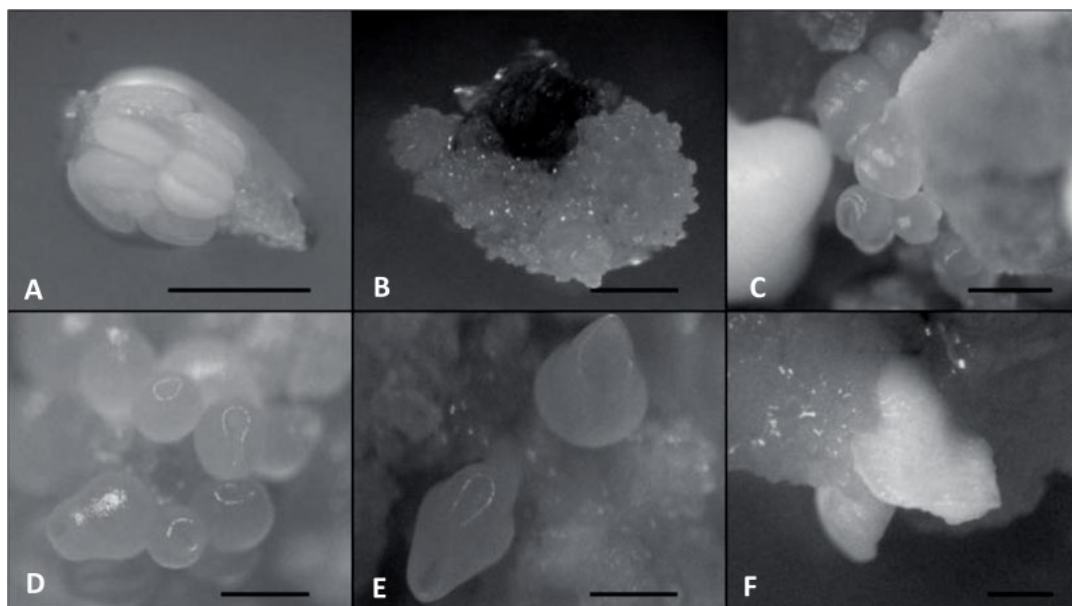
Penggunaan kultur anther atau serbuk sari karet dapat digunakan untuk menghasilkan tanaman haploid atau haploid ganda, pemetaan gen, transformasi genetik, dan pembentukan klon-klon baru. Secara konvensional mendapatkan galur murni (haploid ganda) tanaman karet dibutuhkan waktu lebih dari 30 tahun. Penggunaan galur murni melalui kultur anther dapat mempercepat proses pemuliaan pada tanaman tahunan menyerbuk silang seperti karet.

Penelitian kultur anther pada tanaman karet dimulai oleh peneliti asal Srilangka sejak tahun 1972 (Satchuthananthavale & Irugalbandara, 1972). Penelitian awal ini berhasil mendapatkan kalus namun belum berhasil meregenerasikannya. Walaupun belum optimal penelitian telah berhasil meregenerasikan kalus menjadi planlet. Optimasi dilakukan pada media induksi kalus dengan memodifikasi kandungan amonium

nitrat dan kalium nitrat serta menambahkan 2,4-D dan NAA (Chen, Qian, Qin, Xu, & Xiao, 1992).

Berbeda dengan peneliti sebelumnya yang menggunakan anther sebagai eksplan, Jayashree *et al.* (2005) memakai serbuk sari. Pra perlakuan pada anther menggunakan larutan mannitol 0,3 M pada suhu 33°C, dinyatakan dapat meningkatkan pembelahan sel pada serbuk sari yang ditanam pada media N6 yang ditambah 2,4-D 2,0 mg/l dan kinetin 1,0 mg/l.

Kultur anther dari sekelompok kepala sari yang belum berinti dipotong dan diinduksi dalam media induksi kalus yang merupakan Murashige dan Skoog (MS) ditambah dengan 2,4-diclorophenoxyacetic acid 1 mg L<sup>-1</sup>, kinetin 1 mg L<sup>-1</sup>,  $\alpha$ -naphthalene acetic acid 1 mg L<sup>-1</sup> dan sukrosa pada berbagai konsentrasi mulai dari 3 hingga 10%. Hasil penelitian mengungkapkan bahwa induksi kalus tertinggi (87,5%) diperoleh pada kalus dengan penambahan sukrosa. Hasil evaluasi dengan *flow cytometry* menunjukkan bahwa regenerasi memiliki tingkat ploidi yang sama dengan tanaman tetuanya (Srichuay, Kalawong, Sirisom, & Te-chato, 2014).



Gambar 3. Perkembangan embrio somatik (SE) dari kultur anther *Hevea brasiliensis*: (A) anther yang akan di inokulasi; (B) kalus 4 minggu dalam media induksi kalus (media yang digunakan MS yang diberi 5% sukrosa, 2,4-D 1 mg L<sup>-1</sup>, kinetin mg

L<sup>-1</sup>, dan NAA 1 mg L<sup>-1</sup>); (C) perkembangan embrio somatik 8 minggu di media induksi kalus lanjutan (media: MS diberi sukrosa 3 %, NAA 0,2 mg L<sup>-1</sup>, BA 1 mg L<sup>-1</sup>, kinetin 3 mg L<sup>-1</sup>, dan 0,05 GA<sub>3</sub> 0,05 mg L<sup>-1</sup>); (D) dan (E) SE 8 minggu pada media induksi kalus lanjutan, dengan penambahan sukrosa 5 %, 2,4-D, 1 mg L<sup>-1</sup>, kinetin 1 mg L<sup>-1</sup>, dan 1 NAA 1 mg L<sup>-1</sup> dalam keadaan gelap selama 4 minggu; (F) fase kotiledonari pada media MS dengan penambahan sukrosa 2,4-D 1 mg L<sup>-1</sup>, kinetin 1 mg L<sup>-1</sup>, dan NAA 1 mg L<sup>-1</sup> dalam keadaan gelap selama 4 minggu (skala bar = 1 mm) (Sumber: Srichuay *et al.*, 2014).

**Figure 3.** *Somatic embryo development (SEms) from Hevea brasiliensis anther culture: (A) Anther to be inoculated; (B) 4 week callus in induction media (MS added with sucrose 5%, 2,4-D 1 mg L<sup>-1</sup>, kinetin (KN) 1mg L<sup>-1</sup>, and NAA 1 mg L<sup>-1</sup>); (C) 8 week SEms developed on MS medium supplemented with 3% sucrose, 0.2 mg L<sup>-1</sup> NAA, 1 mg L<sup>-1</sup> 6-benzyladenine, 3 mg L<sup>-1</sup> KN and 0.05 mg L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> without light for 4 weeks; (D) and (E) 8 week SEms at different stages of development on MS medium supplemented with 5% sucrose, 1 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D, 1 mg L<sup>-1</sup> KN and 1 mg L<sup>-1</sup> NAA without light for 4 weeks; (F) Cotyledonary stage embryos on MS medium supplemented with 5% sucrose, 1 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D, 1 mg L<sup>-1</sup> KN and 1 mg L<sup>-1</sup> NAA in without light for 4 weeks (Scale bars = 1 mm)(Source: Srichuay et al., 2014).*

### Kultur Protoplas

Sejak pertama kali dilaporkan oleh Takabe *et al.* (1971) bahwa regenerasi protoplas tembakau dapat menjadi tanaman lengkap, teknik isolasi ini pada tanaman lain mulai dikerjakan, tidak terkecuali pada tanaman karet. Kultur protoplas sendiri adalah merupakan biakan sel yang telah dihilangkan dinding selnya. Sel ini selanjutnya digunakan untuk hibridisasi somatik. Dalam hibrida somatik, dua sel tanaman dapat difusikan menjadi satu sel, kemudian diregenerasikan menjadi tanaman lengkap. Teknik protoplas diharapkan dapat memperluas keragaman genetik dan mendapatkan klon-klon unggul baru tanaman karet.

Kultur protoplas pada tanaman karet sendiri telah mulai dikerjakan pada tahun 1979. Isolasi protoplas dilakukan pada daun *H. brasiliensis* dan *H. pauciflora*. Walaupun keberhasilannya sangat rendah karena beberapa kendala, penelitian tersebut dapat menjadi acuan dalam penelitian selanjutnya. Diantara peneliti yang berhasil melakukan isolasi protoplas pada tanaman karet adalah Nurhaimi-Haris *et al.* (1993). Penelitiannya berhasil mengisolasi protoplas yang berasal dari kalus anther karet. Larutan suspensi yang dipakai adalah campuran 1% hemiselulase, 2% selulase, 1% maserase, dan 8% manitol. Peneliti lain

yang melakukan kultur protoplas pada tanaman karet adalah Sushamakumari, Sobha, Rekha, Jayasree, dan Asokan (2000), yang melaporkan bahwa telah berhasil meregenerasikan tanaman berasal dari protoplas karet melalui jalur embriogenesis somatik.

Sushamakumari *et al.* (2000) menunjukkan untuk pertama kalinya bagaimana regenerasi tanaman dari protoplas *H. brasiliensis*. Kalus embriogenik diinduksi pada infloresensi imatur dan integumen bagian dalam biji imatur. Dinding sel kalus secara enzimatik dicerna dan protoplas yang dihasilkan dikultur pada membran nitroselulosa di atas media semi-padat yang mengandung sel-sel perawat lolium multiflorum. Sebanyak 40% dari kalus embriogenik beregenerasi menjadi embrio somatik setelah disubkultur ke media dasar MS. Setelah 3 bulan disubkultur kecambah dari pusi protoplas telah dihasilkan.

### Rekayasa genetik

Perkembangan penelitian eksplorasi gen memanfaatkan teknologi rekayasa genetik pada tanaman karet diharapkan dapat mempercepat proses perbaikan genetik tanaman karet, terutama dalam meningkatkan produksi lateks, hasil kayu, toleransi terhadap cekaman abiotik atau biotik, bahkan produksi protein rekombinan. Sejak embriogenesis somatik tidak

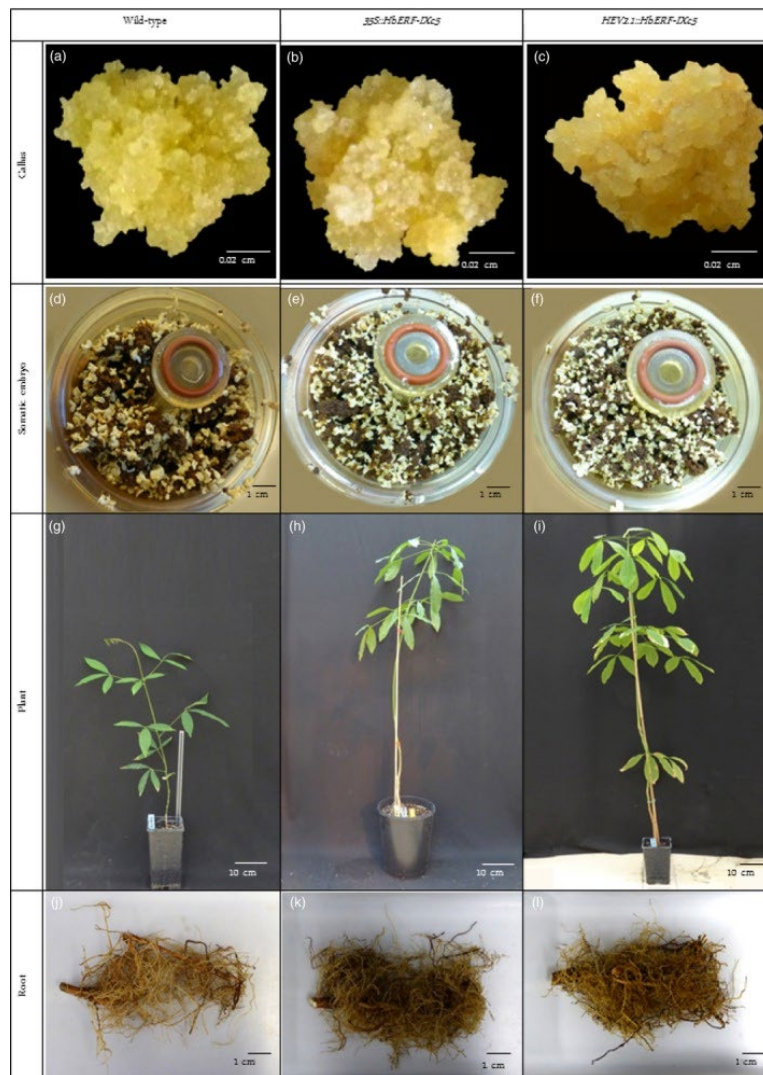
langsung ditemukan, potensi untuk rekayasa genetik dengan transformasi genetik dapat direalisasikan. Penemuan protokol embrio somatik sekunder dari embrio somatik primer juga mendukung proses rekayasa genetik. Dengan cara ini sejumlah embrio hasil rekayasa genetik karet dapat diduplikasi lebih cepat.

Transformasi genetik pada tanaman karet pertama kali dipelopori oleh Arokiaraj & Wan (1991) menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* untuk mempelajari transfer gen ke dalam tanaman karet. Selanjutnya Arokiaraj, Jones, Cheong, Coomber, & Charlwood (1994) berhasil mendapatkan tanaman transgenik menggunakan metode biolistik. Dibandingkan dengan metode biolistik, *A. tumefaciens* lebih banyak digunakan karena memiliki keuntungan menghasilkan tanaman karet transgenik yang stabil dalam jumlah besar (Arokiaraj, 2007). Blanc, Baptiste, Oliver, Martin, & Montoro (2006) telah melaporkan prosedur transformasi yang efisien menggunakan *A. tumefaciens* yang menghasilkan 372 planlet transgenik.

Melalui metode transformasi, beberapa penelitian telah berhasil memindahkan gen ke dalam tanaman karet, diantaranya adalah penanda seleksi untuk ketahanan terhadap cekaman (Venkatachalam *et al.*, 2006; Jayashree *et al.*, 2011; Sobha *et al.*, 2012).

Pemindahan gen yang dimediasi agrobacterium telah menjadi metode terbaik untuk mengirimkan gen asing ke tanaman karet. Untuk mendapatkan kalus embriogenik yang diperlukan dalam proses transformasi digunakan penelitian Venkatachalam *et al.* (2007) dan Montoro, Carron, Granet, Lardet, & Leclercq (2012). Klon PB260 sangat cocok untuk menghasilkan kalus embriogenik dengan kemampuan regenerasi yang tinggi, sehingga sangat ideal untuk transformasi. Saat ini, tanaman hasil transformasi telah diperoleh dari penelitian Lestari *et al.* (2018) dan Martin *et al.* (2018).

Kekhawatiran tentang hasil rekayasa genetik dan adanya peraturan tentang produk rekayasa genetik sampai saat ini masih merupakan suatu kendala dalam pengembangan penelitian yang menggunakan rekayasa genetik. Pengeditan genom dan regenerasi dari protoplas menawarkan cara baru untuk memodifikasi DNA tanaman karet tanpa memasukkan DNA asing. Cara baru ini diharapkan dapat meringankan kekhawatiran terkait dengan tanaman rekayasa genetika.



Gambar 4. Keragaan regenerasi tanaman dari kalus embriogenik hasil transgenik HbERF-IXc5 dan tidak ditransformasi: (a) kalus non transgenik, (b) transgenik TS19A90, (c) transgenik TS20A75, (d) kalus coklat dan embrio somatik tidak ditransformasi di RITA, (e) transgenik TS19A90, (f) transgenik TS20A75, (g) tanaman tidak ditransformasi umur 12 bulan, (h) tanaman transgenik TS19A90, (i) TS20A75, (j) perakaran non transgenik, (k) transgenik TS19A90, (l) transformasi TS20A75 (Sumber: Lestari *et al.*, 2018).

*Figure 4. Description of plant regeneration from friable callus lines of wild-type and HbERF-IXc5 transgenic lines: (a) callus of wild-type, (b) transgenic lines TS19A90 (b), (c) transgenic TS20A75, (d) view of RITA system with brown callus and somatic embryo of wild-type, (e) transgenic lines TS19A90, (f) TS20A75, (g) 12-month-old plant of wild-type, (h) transgenic lines TS19A90, (i) TS20A75, (j) root system of wild-type, (k) transgenic lines TS19A90, (l) TS20A75 (Source: Lestari *et al.*, 2018).*

## PENUTUP

Penggunaan kultur *in vitro* diharapkan dapat memudahkan dalam memproduksi benih unggul dan perbaikan genetik tanaman karet. Tidak hanya dapat menghilangkan variasi yang ditemukan pada batang bawah, tetapi juga

untuk keseragamam batang atas. Banyak faktor yang memberikan pengaruh penting terhadap pembentukan embriogenesis somatik diantaranya: genotipe, jenis eksplan, jumlah zat pengatur tumbuh dan zat penambah pertumbuhan lainnya, komposisi media dasar,

dan intensitas cahaya. Saat ini, penggunaan embrio somatik yang dapat diandalkan masih terbatas hanya pada beberapa genotipe karet unggul. Selain untuk tujuan perbanyakan tanaman, teknik kultur *in vitro* pada tanaman karet juga dimanfaatkan untuk tujuan perbaikan genetik tanaman. Beberapa penelitian untuk peningkatan produktivitas dan toleransi terhadap cekaman abiotik atau biotik, telah dilakukan dengan menggunakan aplikasi teknik kultur anther, kultur protoplas, dan rekayasa genetik.

## DAFTAR PUSTAKA

- Admojo, L., Indrianto A., & Hadi, H. (2014). Perkembangan penelitian induksi kalus embriogenik pada jaringan vegetatif tanaman karet klonal (*Hevea Brasiliensis* Muell. Arg). *Warta Perkaretan*, 33(1), 19-28.
- Anon. (1984). Annual Review of the Rubber Research Institute of Sri Lanka, *Sri Lanka*, Pp. 14.
- Arokiaraj, P. (2007). *Rubber*. In: E. C. Pua and M. R. Davey (eds). *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 60 Transgenic Crops V. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag, 371-386.
- Arokiaraj, P., & Wan, A. R. (1991). Agrobacterium-mediated transformation of hevea cells derived from in vitro and in vivo seedling cultures. *J. Nat. Rub. Res*, 6, 55-61.
- Arokiaraj, P., Jones, Cheong, K.F., Coomber, S. & Charlwood. B.V. (1994). Gene insertion into *Hevea brasiliensis*. *Plant Cell Reports*, 13, 425-430.
- Asokan, M. P., Sobhana, P., Sushamakumari, S., & Sethuraj, M. R. (1988). Tissue culture propagation of rubber (*Hevea brasiliensis* Willd ex Adrg. De Juss. Muell. Arg) clone GT1. *Indian Journal of Natural Rubber Research*, 1, 10-12.
- Bintarti, A. F. (2015). Perkembangan kultur *in vitro* pada tanaman karet (*Hevea Brasiliensis* Müell. Arg.) melalui embriogenesis somatik di Cirad Perancis. *Warta Perkaretan*, 34 (1), 1-10.
- Blanc, G., Baptiste, C., Oliver, G., Martin, F., & Montoro, P. (2006). Efficient Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of embryogenic calli and regeneration of *Hevea brasiliensis* Mull Arg. *Plants Plant Cell Rep*, 24, 724-733.
- Bouychou, J. G. (1953). La culture in vitro des tissues d'hevea. *proc. rubb. conf. Bogor, 1952. Archives of Rubber Cultivation*, 30,50-53.
- Carron, M. P. (1980). Induction et croissance de cals chez *Hevea brasiliensis*. *Caoutch Plast*, 597, 65-59.
- Carron, M. P., & Enjalric, F. (1983). Studies on vegetative propagation of *Hevea brasiliensis* by somatic embryogenesis and in vitro microcutting. In: Fujiwara, A (Ed.). *Plant Tissue Culture*, Maruzen, Tokyo, 751-752.
- Carron, M. P., Enjalric, F., Lardet, L. & Deschamps, A. (1989). Rubber (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry: trees* (Ed. Y.P.S. Bajaj), Springer-Verlag, Berlin, 5, 222-246.
- Carron, M. P., Etienne, H., Lardet, L., Campagha, S., Perrin, Y., Leconte, A., & Chaîne C. (1995). Somatic embryogenesis in rubber (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) In: Jain S.M., Gupta. P and Newton. R (Eds.) *Somatic embryogenesis in woody plants*. Kluwer Academic Publisher, The Netherlands, 2, 117-36.
- Chen, Z., Qian, C., Qin, M., Xu, X., & Xiao, Y. (1992). Recent advances in anther culture of *Hevea brasiliensis* (Muell. Arg). *Theoretical and Applied Genetics*. 62, 103-138.
- Darojat M. R., & Pasaribu. S. S. (2015). Perbanyakan tanaman karet menggunakan embriogenesis somatik. *Warta Penelitian dan Pengembangan Tanaman Industri*, 21(3), 7-10.
- Edussuriya, C. P. (2004). In vitro micrografting in rubber (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). *Research Report of Bachelor of Science in*

- Agriculture, Univ. of Ruhuna, Kamburupitiya, Sri Lanka*, 21-31.
- Enjalric, F., Caron, M. P., & Lardet, L. (1987). Contamination of primary cultures in tropical areas: The case of *Hevea brasiliensis*. International Symposium Cork, Ireland. *Acta Horticulture*, 225:, 57-65.
- Etienne, H., Berger, A., & Carron, M. P. (1991a). Water status of callus from *Hevea brasiliensis* during induction of somatic embryogenesis. *Physiological Plantarum*, 82, 213-218.
- Gunatilleke, I. D., & Samaranyake, C. (1988). Shoot tip as a method of micropropagation of hevea. *Journal of Rubber Research Institute of Sri Lanka*, 68, 33-44.
- Harahap, P. S., Siregar, L.A.M., & Husni.Y. (2014). Kajian awal: Respon eksplan nodus dalam inisiasi tunas mikro tanaman karet (*Hevea brasiliensis* Muell Arg.) dalam medium MS. *Jurnal Online Agroekoteknologi*, 3(1), 229–237.
- Haryanto, B. (2012). *Budidaya karet unggul (1st ed)*. Yogyakarta: Pustaka Baru Press. 240 hlm.
- Housti, F., Coupe, M., & d' Auzac, J. (1991). Facteurs enzymatiques du brunissement in vitro et capacite embryogene des cals d' *Hevea brasiliensis*. C.R. *Academic Science Paris (III)*, 313, 461-466.
- Jayashree, Sobha, S., Rekha, K., Supriya, R., Vineetha, M., Sushamakumari, S., Kala, R.G., Jayasree, P.K., Thulaseedharan, A., Annamalainathan, K., Nair, D.B. Sreelatha, S., Krishnakumar, R., & Jacob, J. (2011). Overexpression of MnSOD and related drought tolerant traits in MnSOD Transgenic *Hevea brasiliensis*. *Natural Rubber Research*, 24 (1),18-27.
- Jayasree, P.K., & Thulaseedharan, A. (2001). Gibberellic acid regulated embryo induction and germination in *Hevea brasiliensis*. *Indian Journal of Natural Rubber Research*, 14, 106-111.
- Jayasree, P. K., & Thulaseedharan, A. (2004). Initiation and maintenance of long term somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*. *IRRDB Biotechnology Workshop*, 9-11 Feb 2004, Kuala Lumpur, Malaysia. Pp. 56.
- Jayasree, P. K., Asokan, M. P., Sobha, S., Sankari Ammal, L., Rekha, K., Kala, R.G., Jayasree, R., & Thulaseedharan, A. (1999). Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature anthers of *Hevea brasiliensis* (Muell. Arg). *Current Science*,76, 1242-1245.
- Jayatillake, K. M. D. P. (2007). Studies on micrografting of *Hevea brasiliensis* and female florets culture of hevea for somatic embryogenesis. *Research Report of Bachelor of Science in Agriculture*, University of Ruhuna, Kamburupitiya, Sri Lanka, 22-36.
- Kala, R. G., Asokan, M. P., Kumari Jayasree, P., Sobha, S., Jayashree, R., Rekha, K., & Thulaseedharan, A. (2002). In vitro micrografting in *Hevea brasiliensis*: Optimization of conditions. *Indian Journal of Natural Rubber Research*, 15, 165-171.
- Lardet, L., Aguilar, M. E., Michaux- Fermere, N. & Berthouly, M. (1998). Effect of strictly plant related factors on the response of *Hevea brasiliensis* and *Theobroma cacao* nodal explants cultured in vitro. *In Vitro Celular Development Biology (Plant)*, 34, 34-40.
- Lestari, R., Rio, M., Martin, F., Leclercq, J., Woraathasin, N., Roques, S., Dessailly, F., Clement-Vidal, A., Sanier, C., Fabre, D., Melliti, S., Suharsono., & Montoro, P. (2018). Overexpression of *Hevea brasiliensis* ethylene response factor HbERF-IXc5 enhances growth and tolerance to abiotic stress and affects laticifer differentiation. *Plant Biotechnology Journal*, 16, 322–336.
- Linossier, L., Veisseire, P., Cailloux, F & Coudret, A. (1997). Effect of abscisic acid and high concentrations of PEG on *Hevea brasiliensis* somatic embryos development. *Plant Science*, 124, 183-191.
- Mayati N. C. H., & Jamnah A. R. (2014). Induction Of Shoots And Roots From Vegetative Tissue Culture Of *Hevea Brasiliensis* Rim 2020. *Journal Trop. Plant Physiol*, 6, 1-9Montoro, P., Etienne,

- H., Michaux-Ferriere, N., & Carron, M. P. (1993). Callus friability and somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 33, 331-338.
- Montoro, P., Carron, M.P., Granet, F., Lardet, L., & Leclercq, J. (2012). Development of new varietal types based on rejuvenation by somatic embryogenesis and propagation by conventional budding or microcutting in *Hevea brasiliensis*. *Acta Hort*, 961, 547.
- Nurhaimi-Haris, Sumaryono, & Carron, M.P. (2009). Pengaruh bahan prasterilan, tutup tabung kultur, dan musim terhadap tingkat kontaminasi eksplan pada kultur microcutting karet. *Menara Perkebunan*, 77(2), 89-99.
- Nurhaimi-Haris, Sumaryono, Siswanto, Sumarmadji, Kasi, D.P., & Carron, M. P. (2009). Teknologi microcutting untuk perbanyakan bahan tanam karet. *Lokakarya Nasional Pemuliaan Tanaman Karet*. Pusat Penelitian Karet.
- Paranjothy, K. (1974). Induced root and embryoid differentiation in *Hevea brasiliensis* in culture. *3rd International Congress of Plant Tissue and Cell Culture*. Univ. Leicester, no. 67.
- Perrin Y., Lardet, L., Enjalric, F., & Carron, M. P. (1994). Rejuvenation of mature clones of *Hevea brasiliensis* (Muell. Arg) by in vitro micrografting. *Canadian Journal of Plant Science*, Kluwer Academic Publisher, The Netherlands, 74, 623-630.
- Piyatrakul, P., Putranto, R.A., Martin, F., Rio, M., Dessailly, F., Leclercq, J., Dufayard, J.F., Lardet, L., & Montoro, P. (2012). Some ethylene biosynthesis and AP2/ERF genes reveal a specific pattern of expression during somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*, *BMC Plant Biol*, 12,244.
- Sari P.R., & Supijatno. (2015). Pengelolaan Pembibitan Karet (*Hevea brassiliensis* Muel Arg.) di Balai Penelitian Sembawa, Palembang, Sumatera Selatan, *Buletin Agrohorti*, 3 (2), 252 – 262
- Satchuthananthavale, R., & Irugalbandara, Z. E. (1972). Propagation of callus from hevea anthers. *Quarterly Journal of Rubber Research Institute of Ceylon*, 49, 65-68.
- Seneviratne, P. (1991). Micropropagation of juvenile and mature *Hevea brasiliensis*. PhD. Thesis, University of Bath, UK, 48-167.
- Seneviratne, P., & Flegmann, A. W. (1996). The effect of thidiazuron on axillary shoot proliferation of *Hevea brasiliensis* in vitro. *Journal of Rubber Research Institute of Sri Lanka*, 77, 1-14.
- Seneviratne, P., & Wijesekara, G. A. S. (1997). Effect of episodic growth pattern on in vitro growth of *Hevea brasiliensis*. *Journal of Plantation Crops*, 25, 52-56.
- Shiji, Z., Zherghua C., & Xueng, X. (1990). A summary report on anther culture for haploid plants of *Hevea brasiliensis*. *Proceedings of IRRDB symposium on Breeding of Hevea brasiliensis*, Kuming, China, 5-6 October, 69-78.
- Sirisom Y. & Te-chato S. (2014). Callus Induction and Somatic Embryogenesis from Anther Cultures of *Hevea brasiliensis* Muell Arg. Wutthichai Srichuay, Soontreeya Kalawong. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)*, 48, 364 – 375.
- Sobha, S., Sushamakumari, S., Rekha, K., Jayashree, R., Kala, R.G., Supriya, R., &Thul aseedarhan, A. (2012). Factor promoting Agrobacterium mediated genetic transformation efficiency in *Hevea brasiliensis*. *Rubber Science*, 25 (2), 173-182.
- Sompong, T. C., & Muangkaewngam, A. (1992). Tissue culture of rubber 1. In vitro micropropagation of rubber. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 14, 123-132.
- Srichuay, W. Kalawong, S., Sirisom, Y., & Te-chato, S. (2014). Callus Induction and Somatic Embryogenesis from Anther Cultures of *Hevea brasiliensis* Muell Arg. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)*, 48, 364 – 375
- Sundari, L., Siregar, L.A.M., & Hanafia, D.S. (2014). kajian awal: Respon eksplan nodus dalam inisiasi tunas mikro tanaman karet (*Hevea brasiliensis* Muell Arg.) dalam

- medium WPM. *Jurnal Online Agroekoteknologi*, 3(1), 179-189.
- Sushamakumari, S., Sobha, S., Rekha, K., Jayashree, R., & Asokan, M.P. (2000). Influence of growth regulators and sucrose on somatic embryogenesis from immature inflorescence of *Hevea brasiliensis* (Muell. Arg.). *Indian Journal of Natural Rubber Research*, 13, 19-29.
- Veisseire, P., Linossier, L., & Coudret, A. (1994). Effect of abscisic acid and cytokinins on the development of somatic embryos in *Hevea brasiliensis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 39, 219-23.
- Venkatachalam, P., Jayashree, R., Rekha, K., Sushmakumari, S., Sobha, S., Jayashree, P., Kala, R. G., & Thulaseedharan, A. (2006). Rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). In: Wang K (ed) *Methods in molecular biology* (Vol 344): *Agrobacterium protocols* (Vol 2), *Humana Press Inc.*, NJ, 153-164.
- Wang, Z. Y., & Chen, X. T. (1995). Effect of temperature on stamen culture and somatic plant regeneration frequencies in stamen culture of rubber tree. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*, 6, 166-168.
- regeneration frequencies in stamen culture of rubber trees. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*, 6, 166-168.
- Wilson, H. M., & Street, H. E. (1975). The growth, anatomy and morphogenetic potential of callus and cell suspension cultures of *Hevea brasiliensis*. *Annals of Botany*, 39, 671-682.
- Zhoul Quan-Nan, Jiang Ze-Hai, Huang Tian-Dai, Li Wei-Guo, Sun Ai-Hua, Dai Xue-Mei, & Zhe Li. (2010). Plant regeneration via somatic embryogenesis from root explants of *Hevea brasiliensis*. *African Journal of Biotechnology*, 9(48), 8168-8173.
- Wang, Z., Zeng, X., Chen, C., Wu, H, Li Q. Fan, G., & Lu, W. (1980). Induction of rubber plantlets from anther of *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. *In vitro Chinese Journal of Tropical Crops*, 1, 25-26.
- Wang, Z.Y. Wu, H.D., & Chen, X.T. (1998). Effect of altered temperatures on plant