

ABSTRACT

The reduced thiols content (RSH) is one of the biochemical parameters of latex Diagnosis (LD) in rubber trees (*Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Muell. Arg.) associated with the risk of Tapping Panel Dryness (TPD), a physiological syndrome induced by over-accumulation of Reactive Oxygen Species (ROS). However, RSH is difficult to interpret due to the influence of the environment. The dissertation research aims to observe the variation of antioxidant content in latex of rubber clones, to study the evolution of RSH content in response to different stress of tapping, ethephon stimulation, and TPD occurrence, to understand the RSH regulation in different stress types and duration, to identify the better way to interpret RSH value in relation with harvesting stress and TPD occurrence, and to examine the ratio of reduced to oxidised form of antioxidants as the estimator of stress level in *H. brasiliensis* latex. This work is also the first attempt at genetic analysis to identify Quantitative Trait Locus (QTL) related to antioxidant traits. The project was started in February 2019. Following preparation and a series of laboratory training in 2019 – 2020, field experiments were carried out from January to July 2021 at Sembawa Research Centre, Indonesian Rubber Research Institute, Palembang, Indonesia. Four field trials were established to study: 1. the clonal variation of antioxidants in five recommended rubber clones, 2. the effect of tapping and ethephon stimulation on the yield, latex flow, and antioxidants parameters, 3. the effect of TPD occurrence, and 4. genetic analysis of main antioxidant parameters. Clonal variation was performed on ten-year-old trees of five recommended rubber clones i.e. IRR 118, BPM 24, IRR 112, RRIC 100, and PB 260 which were selected based on latex metabolism characteristics. The trees were tapped on the B0-1 with S/2 d3 ET2.5% 12/y tapping system. The effect of harvesting systems was studied on clones IRR 118 and BPM 24 using four harvesting systems (S/2 d6, S/2 d3, S/2 d1, and S/2 d3 ET2.5% 12/y). Data were collected four months after the application of treatments. The effect of TPD was examined on five recommended clones i.e. IRR 118, BPM 24, IRR 112, RRIC 100, and PB 260 tapped with S/2 d3 ET 2.5% 12/y on the B0-1 panel. Heritability and QTL analysis was performed on 103 PB 260 (TPD susceptible clone) x SP 217 (TPD tolerant clone) progenies. Observed parameters associated with latex production included latex yield, initial flow (IF), plugging index (PI), and bursting index (BI). For LD, total solid content (TSC), sucrose content (Suc), inorganic phosphorus content (Pi), and RSH were determined. The observed antioxidants included reduced and oxidised forms of ascorbate (AsA and DHA) and glutathione (GSH and GSSG). Cofactors associated with antioxidants regeneration were assessed, including oxidised and reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NAD, NADH), and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP, NADPH). Heritability and QTL analysis was performed on RSH, AsA, DHA, total AsA, and the ratio of AsA/DHA. The results showed that the concentration in AsA is about ten times higher than GSH in laticifer, while GSH accounts for about 50 % of RSH. The RSH and its related parameters (GSH and GSSG) varied among rubber clones, while AsA, DHA, and antioxidant cofactors (NADH, NAD, NADPH, and NADP) were not

significantly different among observed clones. For short-term harvesting stress, RSH increases with tapping frequency and ethephon stimulation and then drops in long-term stress, usually accompanied by TPD occurrence which is associated with high latex viscosity and luteoid bursting. These results suggest that a high level of RSH shows the capacity of laticifer metabolism to cope with harvesting stress, while a drop in RSH is a sign of prolonged stress related to lower metabolic activity and TPD occurrence. For better interpretation, reference of maximum RSH value under short-term high-stress and minimum value in long-term high-stress conditions are required as well as information related to harvesting system history, plant age, TPD percentage, and other LD parameters data (TSC, Suc, and Pi). The analysis of the reduced and oxidised forms of antioxidants could not give a clear direction of the oxidation, regeneration, and biosynthesis level of antioxidants. The high proportion of reduced antioxidant forms suggests that laticifers have a strong capacity to maintain reduction capacity. The highest heritability was RSH 0.69, while other traits were lower than 0.2. The QTL could not be detected for RSH, AsA, DHA, total AsA, and the ratio of AsA/DHA. Further investigation under higher and longer stresses, as well as larger samples, is recommended for a clearer effect of tapping, ethephon stimulation, and TPD on the antioxidants and cofactors evolution and QTL mapping.

Keywords: ascorbate, ethephon, glutathione, latex flow, rubber, tapping, thiols, yield

RÉSUMÉ

La teneur réduite en thiols (RSH) est l'un des paramètres biochimiques du latex Diagnostic (LD) chez l'hévéa (*Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Muell. Arg.) associé au risque de Tapping Panel Dryness (TPD), un syndrome physiologique induit par une suraccumulation de Espèces réactives de l'oxygène (ROS). Cependant, RSH est difficile à interpréter en raison de l'influence de l'environnement. La recherche de thèse vise à observer la variation de la teneur en antioxydants dans le latex de clones de caoutchouc, à étudier l'évolution de la teneur en RSH en réponse à différents stress de tapotement, de stimulation de l'éthéphon et d'occurrence de TPD, à comprendre la régulation du RSH dans différents types de stress et durée, identifier la meilleure façon d'interpréter la valeur RSH en relation avec le stress de récolte et l'occurrence de TPD, et examiner le rapport entre la forme réduite et la forme oxydée des antioxydants comme estimateur du niveau de stress dans le latex de *H. brasiliensis*. Ce travail est également la première tentative d'analyse génétique pour identifier le locus quantitatif des traits (QTL) lié aux traits antioxydants. Le projet a débuté en février 2019. Après la préparation et une série de formations en laboratoire en 2019 - 2020, des expériences sur le terrain ont été menées de janvier à juillet 2021 au Sembawa Research Centre, Indonesian Rubber Research Institute, Palembang, Indonésie. Quatre essais sur le terrain ont été établis pour étudier : 1. la variation clonale des antioxydants dans cinq clones de caoutchouc recommandés, 2. l'effet du tapotement et de la stimulation de l'éthéphon sur le rendement, le flux de latex et les paramètres d'antioxydants, 3. l'effet de l'apparition de TPD, et 4 analyse génétique des principaux paramètres antioxydants. La variation clonale a été réalisée sur des arbres de dix ans de cinq clones de caoutchouc recommandés, à savoir IRR 118, BPM 24, IRR 112, RRIC 100 et PB 260, sélectionnés en fonction des caractéristiques du métabolisme du latex. Les arbres ont été saignés sur le B0-1 avec le système de saignée S/2 d3 ET2.5% 12/y. L'effet des systèmes de récolte a été étudié sur les clones IRR 118 et BPM 24 en utilisant quatre systèmes de récolte (S/2 d6, S/2 d3, S/2 d1 et S/2 d3 ET2,5 % 12/an). Les données ont été recueillies quatre mois après l'application des traitements. L'effet de la TPD a été examiné sur cinq clones recommandés, à savoir IRR 118, BPM 24, IRR 112, RRIC 100 et PB 260 tapotés avec S/2 d3 ET 2,5 % 12/an sur le panel B0-1. L'héritabilité et l'analyse QTL ont été réalisées sur 103 des descendances PB 260 (clone sensible au TPD) x SP 217 (clone tolérant au TPD). Les paramètres observés associés à la production de latex comprenaient le rendement en latex, le débit initial (IF), l'indice de colmatage (PI) et l'indice d'éclatement (BI). Pour LD, la teneur totale en solides (TSC), la teneur en saccharose (Suc), la teneur en phosphore inorganique (Pi) et la RSH ont été déterminées. Les antioxydants observés comprenaient des formes réduites et oxydées d'ascorbate (AsA et DHA) et de glutathion (GSH et GSSG). Les cofacteurs associés à la régénération des antioxydants ont été évalués, notamment le nicotinamide adénine dinucléotide oxydé et réduit (NAD, NADH) et le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADP, NADPH). L'analyse de l'héritabilité et du QTL a été effectuée sur RSH, AsA, DHA, AsA total et le rapport AsA/DHA. Les résultats ont montré que la concentration en

AsA est environ dix fois supérieure à celle du GSH dans le laticifère, alors que le GSH représente environ 50 % du RSH. Le RSH et ses paramètres associés (GSH et GSSG) variaient selon les clones de caoutchouc, tandis que l'AsA, le DHA et les cofacteurs antioxydants (NADH, NAD, NADPH et NADP) n'étaient pas significativement différents parmi les clones observés. Pour le stress de récolte à court terme, le RSH augmente avec la fréquence de tapotement et la stimulation de l'éthéphon, puis diminue le stress à long terme, généralement accompagné de l'apparition de TPD qui est associée à une viscosité élevée du latex et à l'éclatement du lutoïde. Ces résultats suggèrent qu'un niveau élevé de RSH montre la capacité du métabolisme des laticifères à faire face au stress de la récolte, tandis qu'une baisse de RSH est un signe de stress prolongé lié à une activité métabolique plus faible et à l'apparition de TPD. Pour une meilleure interprétation, la référence de la valeur RSH maximale dans des conditions de stress élevé à court terme et de la valeur minimale dans des conditions de stress élevé à long terme est requise, ainsi que des informations relatives à l'historique du système de récolte, à l'âge de la plante, au pourcentage de TPD et à d'autres données de paramètres LD. (TSC, Suc et Pi). L'analyse des formes réduites et oxydées des antioxydants n'a pas pu donner une direction claire du niveau d'oxydation, de régénération et de biosynthèse des antioxydants. La forte proportion de formes antioxydantes réduites suggère que les laticifères ont une forte capacité à maintenir la capacité de réduction. L'héritabilité la plus élevée était RSH 0,69, tandis que les autres caractères étaient inférieurs à 0,2. Le QTL n'a pas pu être détecté pour le RSH, l'AsA, le DHA, l'AsA total et le rapport AsA/DHA. Une enquête plus approfondie sous des contraintes plus élevées et plus longues, ainsi que des échantillons plus grands, est recommandée pour un effet plus clair du tapotement, de la stimulation de l'éthéphon et de la TPD sur l'évolution des antioxydants et des cofacteurs et la cartographie QTL.

Mots-clés : ascorbate, éthéphon, glutathion, flux de latex, saignée, thiols, rendement

ABSTRAK

Kadar tiol tereduksi (RSH) adalah salah satu parameter biokimia yang diukur dalam *Latex Diagnose* (LD) pada tanaman karet (*Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Muell. Arg.) yang terkait dengan risiko Kering Alur Sadap (KAS), yaitu suatu sindrom fisiologis yang disebabkan oleh akumulasi *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang berlebihan. Namun demikian, RSH sulit diinterpretasikan karena pengaruh lingkungan. Disertasi ini bertujuan untuk mengamati variasi kandungan antioksidan pada lateks klon karet, mempelajari evolusi kandungan RSH tanggap cekaman penyadapan, stimulasi etefon dan kejadian KAS, memahami regulasi RSH pada berbagai jenis dan durasi cekaman, mengidentifikasi metode yang lebih baik untuk menginterpretasikan nilai RSH dalam kaitannya dengan cekaman penyadapan kejadian KAS, dan untuk menguji rasio antioksidan tereduksi terhadap antioksidan teroksidasi sebagai penduga tingkat cekaman pada lateks *H. brasiliensis*. Disertasi ini juga merupakan upaya pertama dalam analisis genetik untuk mengidentifikasi *Quantitative Trait Locus* (QTL) yang terkait dengan sifat antioksidan. Proyek penelitian ini dimulai pada Februari 2019. Setelah persiapan dan serangkaian pelatihan laboratorium pada 2019 – 2020, percobaan lapangan dilakukan pada Januari hingga Juli 2021 di Pusat Penelitian Sembawa, Pusat Penelitian Karet, Palembang, Indonesia. Empat pengujian lapangan dilakukan untuk mempelajari: 1. variasi klon terhadap kadar antioksidan pada lima klon karet yang direkomendasikan, 2. pengaruh penyadapan, stimulasi etefon, 3. pengaruh kejadian KAS, dan 4. analisis genetik parameter terhadap parameter antioksidan utama. Studi variasi klon dilakukan pada tanaman berumur sepuluh tahun dari lima klon karet yang direkomendasikan yaitu IRR 118, BPM 24, IRR 112, RRIC 100, dan PB 260 yang dipilih berdasarkan karakteristik metabolisme lateks. Tanaman yang diamati disadap pada panel B0-1 dengan sistem sadap S/2 d3 ET2,5% 12/y. Pengaruh sistem sadap diamati pada klon IRR 118 dan BPM 24 menggunakan empat sistem sadap (S/2 d6, S/2 d3, S/2 d1, dan S/2 d3 ET2,5% 12/y). Data dikumpulkan empat bulan setelah penerapan perlakuan. Pengaruh KAS diamati pada lima klon yang direkomendasikan yaitu IRR 118, BPM 24, IRR 112, RRIC 100, dan PB 260 yang disadap dengan S/2 d3 ET 2,5% 12/y pada panel B0-1. Analisis heritabilitas dan QTL dilakukan pada 103 progeni dari PB 260 (klon rentan KAS) x SP 217 (klon toleran KAS). Parameter yang diamati terkait dengan produksi lateks yaitu produksi lateks, aliran awal (IF), indeks penyumbatan (PI), dan *bursting index* (BI). Untuk LD, kadar padatan total (TSC), kadar sukrosa (Suc), kadar fosfat anorganik (Pi), dan RSH ditentukan. Antioksidan yang diamati meliputi askorbat tereduksi dan teroksidasi (AsA dan DHA) dan glutathione (GSH dan GSSG). Kofaktor yang terkait dengan regenerasi antioksidan yang diamati yaitu nikotinamida adenin dinukleotida teroksidasi dan tereduksi (NAD, NADH), dan nikotinamida adenin dinukleotida fosfat teroksidasi dan tereduksi (NADP, NADPH). Analisis heritabilitas dan QTL dilakukan terhadap parameter RSH, AsA, DHA, total AsA, dan rasio AsA/DHA. Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi AsA sekitar sepuluh kali lebih tinggi dibanding GSH dalam latisifer, sedangkan GSH sekitar 50 % dari RSH. Parameter RSH, GSH dan GSSG bervariasi antar klon karet, sedangkan

AsA, DHA dan kofaktor antioksidan (NADH, NAD, NADPH, dan NADP) tidak berbeda nyata antar klon yang diamati. Dalam cekaman jangka pendek, RSH meningkat seiring peningkatan frekuensi penyadapan dan stimulasi etefon dan kemudian turun dalam cekaman jangka panjang disertai kejadian KAS yang dikaitkan dengan peningkatan viskositas lateks dan ledakan lutoid. Hasil ini mengindikasikan bahwa tingkat RSH yang tinggi menunjukkan kapasitas metabolisme latisifer untuk mengatasi cekaman, sementara penurunan RSH merupakan tanda cekaman berkepanjangan terkait aktivitas metabolisme yang lebih rendah dan terjadinya KAS. Untuk interpretasi yang lebih baik, diperlukan referensi nilai RSH maksimum pada cekaman tinggi jangka pendek dan nilai minimum pada kondisi cekaman tinggi jangka panjang serta informasi terkait riwayat sistem sadap, umur tanaman, persentase KAS, dan data parameter LD lainnya (TSC, Suc, dan Pi). Analisis rasio antioksidan tereduksi dan teroksidasi tidak dapat memberikan gambaran yang jelas terhadap tingkat oksidasi, regenerasi, dan biosintesis antioksidan. Tingginya proporsi bentuk antioksidan tereduksi menunjukkan bahwa latisifer memiliki kapasitas yang kuat untuk mempertahankan kapasitas reduksi. Heritabilitas tertinggi dijumpai pada parameter RSH (0,69), sedangkan sifat lainnya lebih rendah dari 0,2. QTL tidak dapat dideteksi untuk RSH, AsA, DHA, total AsA, dan rasio AsA/DHA. Penelitian lebih lanjut direkomendasikan dengan tingkat cekaman yang lebih tinggi dan durasi lebih lama serta sampel yang lebih besar untuk dapat mengetahui efek penyadapan, stimulasi etefon, dan KAS yang lebih jelas serta untuk mengetahui evolusi antioksidan dan kofaktor dan juga untuk pemetaan QTL.

Kata kunci: askorbat, etefon, glutathione, aliran lateks, penyadapan, tiol, produksi