

## PENTINGNYA APLIKASI *MARKER-ASSISTED SELECTION* DALAM SELEKSI KLON KARET TOLERAN KEKERINGAN

*The Importance of Marked-Assisted Selection in The Screening of Rubber Drought Tolerant Clones*

Andi Nur Cahyo

Pusat Penelitian Karet, Jl. Raya Palembang-Pangkalan Balai Km. 29, Banyuasin 30953  
Email: nurcahyo.andi@yahoo.co.uk

Diterima 18 Oktober 2023 / Direvisi 14 November 2023 / Disetujui 8 Desember 2023

### Abstrak

Seleksi klon karet toleran kekeringan sangat mendesak untuk dilakukan karena pada masa yang akan datang diperkirakan kejadian fenomena kekeringan sebagai dampak pemanasan global akan lebih sering terjadi. Untuk melaksanakan hal ini, terdapat satu masalah, yaitu kegiatan pemuliaan tanaman karet dengan metode yang konvensional membutuhkan waktu sekitar 35 hingga 40 tahun karena tanaman karet adalah tanaman tahunan. Salah satu solusi untuk mengatasi masalah ini adalah dengan memanfaatkan metode *Marker-Assisted Selection* (MAS). MAS adalah metode seleksi tanaman yang memanfaatkan marka DNA yang bertautan dengan lokus target sebagai alat untuk menduga fenotipe tanaman yang diinginkan oleh pemulia tanaman. Untuk melaksanakan metode ini diperlukan penentuan QTL dan menganalisis gen-gen dalam QTL yang terasosiasi dengan parameter-parameter toleransi kekeringan pada tanaman karet, misalnya kandungan ROS (*Reactive Oxygen Species*), aktifitas enzim SOD (*Superoxide Dismutase*), POD (*Peroxisidase*), CAT (*Catalase*), kandungan asam absisat (ABA), asam askorbat, tekanan turgor sel, kandungan prolin, laju transpirasi, bukaan stomata, *electrolyte leakage*, tekanan osmosis sel daun, kadar air daun relatif, dan DFI (*Drought Factor Index*). Apabila marker yang diperlukan dalam metode MAS sudah selesai diidentifikasi dan divalidasi, diharapkan metode MAS ini dapat diadopsi untuk memangkas durasi waktu pemuliaan tanaman karet konvensional yang

memerlukan waktu antara 35-40 tahun menjadi kurang dari satu tahun. Tulisan ini bertujuan untuk mengulas parameter fisiologis tanaman yang terasosiasi dengan sifat toleransi kekeringan serta pentingnya metode MAS dalam seleksi klon karet toleran kekeringan.

Kata kunci: antioksidan, gen, *Hevea brasiliensis*, lokus sifat kuantitatif, spesies oksigen reaktif

### Abstract

*The selection of drought-resistant rubber clones is very urgent because in the future it is estimated that drought phenomena as a result of global warming will occur more often. To do this, there is a problem, namely the activity of conventional methods of rubber plants breeding program takes about 35 to 40 years because rubber plant is perennial tree. A solution to overcome this problem is to utilize the Marker-Assisted Selection (MAS) method. MAS is a plant selection method that utilizes DNA markers linked to the target locus as a tool to infer the plant phenotype desired by plant breeders. To carry out this method, it is necessary to determine QTL and analyze genes underlying QTL associated with drought resistance parameters in rubber plants, such as ROS (Reactive Oxygen Species) content, SOD (Superoxide Dismutase), POD (Peroxidase), CAT (Catalase) enzyme activity, abscisic acid (ABA), ascorbic acid content, cell turgor pressure, proline content, transpiration rate, stomatal conductance, electrolyte leakage, leaf cell osmosis pressure, relative leaf moisture content, and DFI (Drought Factor Index). When the markers required in the MAS method have been identified and validated, the MAS method can be adopted to cut the duration of*

*conventional rubber plant breeding time that takes between 35-40 years to less than one year. This paper aimed to review plant physiological parameters associated with drought tolerance and the importance of the MAS method in the selection of drought-tolerant rubber clones.*

*Keywords: antioxidant, gene, Hevea brasiliensis, quantitative trait loci, reactive oxygen species*

## Pendahuluan

*Marker-Assisted Selection (MAS)* adalah metode seleksi tanaman yang memanfaatkan marka DNA yang bertautan dengan lokus target sebagai alat untuk menduga fenotipe yang diinginkan oleh pemulia tanaman. Metode MAS untuk seleksi tanaman ini selain bisa diterapkan pada tanaman semusim, juga bisa diterapkan pada tanaman tahunan, misalnya tanaman karet. Metode MAS ini menjadi sangat penting pada tanaman karet dapat memangkas waktu yang dibutuhkan untuk proses pemuliaan tanaman karet dari sekitar 35 hingga 40 tahun menjadi beberapa bulan saja ketika tanaman karet masih dalam stadia awal pertumbuhannya apabila marker untuk sifat yang diinginkan pemulia tanaman karet sudah diketemukan dan divalidasi (An *et al.*, 2019; Pootakham *et al.*, 2020; Priyadarshan, 2017; Xu & Crouch, 2008). Metode MAS memungkinkan diaplikasikan untuk seleksi ribuan genotipe dengan cara ekstraksi DNA tanaman yang akan diseleksi, kemudian dilakukan proses PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dengan memakai marker gen-gen sifat toleran kekeringan. Hasil amplifikasi yang diperoleh kemudian divisualisasikan dengan proses elektroforesis untuk mengetahui keberadaan gen-gen pembawa sifat toleran kekeringan pada individu tanaman yang diseleksi.

Pada tanaman karet, salah satu parameter seleksi yang saat ini mendesak untuk dilakukan seleksi adalah parameter toleransi tanaman karet terhadap kekeringan. Hal ini terkait dengan fenomena perubahan iklim sebagai akibat dari fenomena pemanasan global. Salah satu akibat dari fenomena

pemanasan global adalah terjadinya musim kemarau yang diprediksi menjadi lebih panjang pada masa yang akan datang (Intergovernmental Panel on Climate Change, 2018). Sementara itu, curah hujan dengan intensitas 125 mm/bulan diperlukan untuk menjaga laju pertukaran O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> dalam kondisi yang optimum (Vijayakumar *et al.*, 1998). Kurangnya ketersediaan air mempengaruhi beberapa parameter fisiologis tanaman, seperti: tekanan osmotik dan tekanan turgor, konduktansi stomata, fotosintesis, transpirasi, respirasi, aktivitas antioksidan (Falqueto *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2013; Velázquez-Márquez *et al.*, 2015; Wang, 2014; Z. Wang *et al.*, 2018).

Di lain pihak, meskipun terdapat klon yang toleran kekeringan misalnya RRIM 600 (Krishan, 2017; Luke *et al.*, 2015; Thomas *et al.*, 2015), banyak klon unggul tanaman karet yang saat ini direkomendasikan sensitif terhadap kekeringan misalnya klon PB 260 (Sanier *et al.*, 2013). Klon dengan sifat sensitif terhadap kekeringan ini mempunyai karakter menggugurkan daun yang cepat pada awal musim kemarau, sehingga produksinya menjadi cepat menurun dan dapat mencapai 50% dibandingkan produksi karet pada musim hujan. Untuk mengatasi hal ini, diperlukan program pemuliaan tanaman untuk menyeleksi klon-klon yang toleran terhadap kekeringan berdasarkan parameter-parameter yang berhubungan dengan sifat toleransi tanaman terhadap kekeringan dalam jangka waktu yang cepat, sehingga produksinya akan tetap dapat dipertahankan pada saat musim kemarau. Tulisan ini bertujuan untuk mengulas parameter fisiologis tanaman yang terasosiasi dengan sifat toleransi kekeringan serta pentingnya metode MAS dalam seleksi klon karet toleran kekeringan.

## Parameter Seleksi Klon Karet terhadap Toleransi Kekeringan

Untuk menyeleksi tanaman yang toleran terhadap kekeringan (termasuk tanaman karet), terdapat beberapa parameter yang dapat digunakan sebagai dasar seleksi, yaitu

parameter biokimia dan fisiologis tanaman. Beberapa parameter biokimia tanaman yang dapat dijadikan sebagai kriteria seleksi tanaman karet yang toleran terhadap kekeringan misalnya kandungan ROS (*Reactive Oxygen Species*), aktifitas enzim SOD (*Superoksida Dismutase*), POD (*Peroksidase*), CAT (*Catalase*), kandungan asam absisat (ABA), asam askorbat, tekanan turgor sel, dan kandungan prolin. Untuk parameter fisiologis tanaman, dapat digunakan beberapa parameter, misalnya laju transpirasi, bukaan stomata, *electrolyte leakage*, tekanan osmosis sel,

kadar air daun relatif, dan DFI (*Drought Factor Index*).

Kandungan ROS merupakan salah satu parameter yang dapat digunakan untuk menyeleksi tanaman karet yang toleran terhadap kekeringan. Tanaman karet yang toleran terhadap kekeringan misalnya RRIM 600 akan mempunyai kandungan ROS yang rendah setelah terjadi cekaman kekeringan (Luke *et al.*, 2015; Thomas *et al.*, 2015). Hal ini terbukti pada penelitian Santos *et al.* (2019) seperti yang tersaji pada Tabel 1.

Tabel 1. Kandungan ROS (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) pada berbagai klon setelah masa pemulihan dari kondisi cekaman kekeringan

Klon	Kandungan ROS (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , μmol g <sup>-1</sup> berat kering)
GT1	27,52 b
IAC 40	25,46 b
PR 255	31,61 a
RRIM 600	26,66 b

Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang berbeda menunjukkan adanya beda nyata pada P < 0.05 menurut uji Scott and Knott.

Sumber : Santos *et al.* (2019), diolah

ROS terbentuk sebagai akibat dari menutupnya stomata ketika terjadi cekaman kekeringan yang menyebabkan CO<sub>2</sub> tidak bisa masuk ke dalam jaringan daun melalui stomata. Akumulasi ROS dapat menyebabkan kerusakan jaringan dan sel, serta stres oksidatif (Hamim *et al.*, 2017). Stres abiotik adalah penyebab utama stres oksidatif karena kontribusinya terhadap pembentukan ROS. ROS diproduksi di jalur transpor elektron mitokondria dan kloroplas (Kholová *et al.*, 2011). Produksi ROS seperti superoksida anion, hidrogen peroksida, hidroksil radikal, dan oksigen singlet merupakan konsekuensi yang tak terhindarkan dari metabolisme aerobik (Ahmad *et al.*, 2009). Pada saat cahaya tersedia namun stomata tertutup ROS terbentuk di kloroplas dan peroksisom (Foyer & Noctor, 2003), dan ketika cahaya tidak tersedia ROS akan diproduksi di mitokondria (Møller, 2001). Beberapa bentuk ROS

misalnya superoksida anion (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) dan hidrogen peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) diproduksi sebagian besar oleh kloroplas (Ahmad *et al.*, 2009).

Sebagai reaksi tanaman terhadap keberadaan ROS, tanaman membentuk dua mekanisme detoksifikasi ROS, yaitu: (i) antioksidan enzimatis, misalnya superoksida dismutase (SOD), askorbat peroksidase (APX), dan katalase (CAT) (Kholová *et al.*, 2011; Prochazkova *et al.*, 2001); dan (ii) antioksidan non-enzimatis, misalnya asam askorbat (Akram *et al.*, 2017; Mazid *et al.*, 2011). SOD adalah enzim pendetoksifikasi ROS yang mengubah O<sub>2</sub><sup>-</sup> yang terbentuk dalam kondisi cekaman kekeringan menjadi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Taiz & Zeiger, 2002).

CAT merupakan enzim yang berperan pada konversi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> menjadi H<sub>2</sub>O dan O<sub>2</sub> (Fikret *et al.*, 2013). CAT ditemukan pada mitokondria, peroksisom, dan sitosol (Heidari, 2009). Selanjutnya fungsi enzim

APX adalah mengkonversi  $H_2O_2$  menjadi  $H_2O$  dan MDHA (*monodehydroascorbate*) (Kataria, 2017). Pada millet mutiara, aktivitas APX dan CAT meningkat segera setelah terjadi cekaman kekeringan, sedangkan SOD meningkat pada fase kekeringan selanjutnya (Kholová *et al.*, 2011; Patil *et al.*, 2005). Selain itu, asam askorbat adalah substrat utama untuk detoksifikasi ROS. Asam askorbat merupakan sumber elektron yang dibutuhkan oleh APX untuk mengubah  $H_2O_2$  menjadi  $H_2O$  dan  $O_2$  (Akram *et al.*, 2017; Mazid *et al.*, 2011).

Pada saat pembentukan ROS dan antioksidan tidak seimbang, cekaman oksidatif terjadi sehingga menyebabkan perubahan dalam sistem fisiologis tanaman (Ahmad *et al.*, 2008, 2009; Foyer & Noctor, 2000). Kehadiran ROS, seperti  $^1O_2$  dan HO, dapat merusak asam lemak tak jenuh ganda (PUFA) dan meningkatkan kompleks pencampuran yang dibentuk oleh hidroperoksida lipid (Ahmad *et al.*, 2009; Mueller, 2004). Peningkatan PUFA peroksidasi mengurangi fluiditas membran, meningkatkan kebocoran, dan menyebabkan kerusakan sekunder pada protein membran (Ahmad *et al.*, 2009; Halliwell, 2006). Hal ini dapat diamati dengan parameter *electrolyte leakage* (Dionisio-Sese & Tobita, 1998).

Selain ROS dan antioksidan parameter biokimia lain yang menjadi kriteria toleransi tanaman terhadap kekeringan adalah prolin. Akumulasi prolin ini mempunyai hubungan yang positif dengan toleransi tanaman karet terhadap kekeringan (Xavier *et al.*, 2018). Prolin ini dapat berfungsi sebagai osmoregulator. Osmoregulasi adalah kemampuan tanaman untuk mengatur tekanan osmotik sebagai akumulasi solut dalam jaringan tanaman. Klon karet dengan kemampuan osmoregulasi yang tinggi memiliki tingkat tekanan osmotik yang tinggi sehingga mampu mempertahankan turgiditas sel dan kadar air relatif daun selama berada dalam kondisi kekeringan (Karyudi, 2001). Hal ini dapat terjadi karena adanya pengaturan lebar bukaan stomata yang menyebabkan  $CO_2$  tetap dapat masuk ke dalam jaringan daun walaupun dalam jumlah

yang relatif sedikit pada waktu musim kemarau.

Lebar bukaan stomata mempunyai hubungan yang erat dengan konduktansi stomata dan laju transpirasi. Di antara efek kekeringan pada proses fisiologis tanaman karet, perubahan konduktansi stomata adalah yang paling dominan (Sanier *et al.*, 2013). Fotosintesis bersih dan konduktansi stomata yang dipengaruhi oleh kondisi kekeringan menunjukkan kurva hubungan sigmoid (Ceulemans *et al.*, 1984). Salah satu gejala kekeringan adalah layunya daun yang terjadi 25 hari setelah cekaman kekeringan pada klon RRII 105 dan RRII 208 (Krishan, 2017). Selain itu, pada cekaman kekeringan yang parah cabang-cabang juga mengering (Indraty, 2003). Tanaman karet dikategorikan ke dalam golongan C3 (Cahyo *et al.*, 2022a; Liu *et al.*, 2016). Oleh karena itu, penurunan konduktansi stomata pada pohon karet dapat memiliki dua efek. Pertama, penurunan konduktansi stomata menyebabkan turunnya laju transpirasi, sehingga tanaman dapat menghemat serapan air dari tanah dan meningkatkan efisiensi penggunaan air (Chaves *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2018). Kedua, penurunan konduktansi stomata dapat meningkatkan kemungkinan fotorespirasi yang mengurangi akumulasi karbohidrat yang dihasilkan dari proses fotosintesis (Hamim *et al.*, 2017). Oleh karena itu, laju pertumbuhan dan hasil tanaman karet menjadi menurun. Selanjutnya, penutupan stomata mengakibatkan penurunan laju asimilasi  $CO_2$ , maka pada paparan cahaya yang berlebihan, terjadi gangguan fungsional pusat reaksi fotosintesis PSII dan ROS (Reactive Oxygen Species) terbentuk. Akumulasi ROS dapat merusak jaringan dan sel dan menyebabkan stres oksidatif (Hamim *et al.*, 2017).

Semua parameter pengamatan yang berhubungan dengan reaksi tanaman terhadap cekaman kekeringan tercermin pada aktivitas PSII (Photosystem II). Kondisi fisiologis PSII yang juga menggambarkan vitalitas tanaman dapat diamati dengan cara memonitor emisi *chlorophyll fluorescence* (CF) dari PSII. Oleh karena itu, pengukuran CF juga memberikan

informasi tidak langsung tentang kondisi fisiologis tanaman yang dipengaruhi oleh stres kekeringan. Data CF ini dibutuhkan untuk menghitung nilai DFI. DFI adalah parameter integratif yang mencerminkan penurunan *Performance Index* (PI) akibat kekeringan selama periode stres kekeringan. PI memberikan informasi kuantitatif tentang vitalitas tanaman. PI adalah salah satu variabel pada parameter CF (Kalaji *et al.*, 2016; Oukarroum *et al.*, 2007).

PI dihasilkan oleh tiga parameter independen, yaitu: konsentrasi pusat reaksi per klorofil, parameter yang terkait dengan proses fotosintesis, dan parameter yang terkait dengan transpor elektron (Kalaji *et al.*, 2016; Strasser *et al.*, 2004). PI terkait erat dengan *Drought Factor Index* (DFI). DFI menggambarkan pengurangan relatif PI karena kekeringan selama periode stres kekeringan (Kalaji *et al.*, 2016). Prinsip DFI adalah bahwa genotipe toleran kekeringan harus dapat mentolerir stres kekeringan untuk jangka waktu yang lebih lama daripada genotipe sensitif kekeringan (Oukarroum *et al.*, 2007). Strauss *et al.* (2006) menyebutkan bahwa penurunan PI setelah periode kedua stres bisa lebih signifikan (dengan faktor 2) daripada penurunan PI selama periode pertama stres. Akibatnya, genotip yang sensitif terhadap kekeringan menunjukkan penurunan PI tertinggi selama periode kedua stres kekeringan juga memiliki nilai DFI terendah (paling negatif) (Boureima *et al.*, 2012). DFI yang rendah menunjukkan penurunan aktivitas PSII yang lebih besar yang disebabkan oleh kekeringan. DFI yang lebih rendah juga menunjukkan toleransi genotipe yang lebih rendah terhadap kekeringan (Stirbet *et al.*, 2018). DFI telah berhasil digunakan untuk mengurutkan tingkat toleransi kekeringan dari beberapa genotipe beberapa spesies, yaitu *Sesamum indicum* (Boureima *et al.*, 2012), *Cicer arietinum* L. (Çiçek & Arslan, 2015), *Hordeum vulgare* L. (Oukarroum *et al.*, 2007) dan *Elaeis guineensis* (de Raissac *et al.*, 2017).

### **Gen-Gen Pengendali Sifat Fisiologis Yang Berkaitan Dengan Parameter Toleransi Tanaman Terhadap Kekeringan**

Dalam rangka memperpendek waktu yang dibutuhkan untuk menyeleksi tanaman yang toleran terhadap kekeringan terutama pada tanaman tahunan, beberapa peneliti melakukan penelitian untuk mengidentifikasi gen-gen yang mengendalikan sifat toleransi terhadap kekeringan pada beberapa tanaman. Identifikasi gen diperlukan untuk melaksanakan metode MAS yang dapat memperpendek waktu seleksi tanaman. Pada tanaman apel dan tembakau, gen peroxidase (*prx8*) dilaporkan mengendalikan toleransi tanaman terhadap cekaman kekeringan dengan mendetoksifikasi ROS (Vicuna Requesens *et al.*, 2012). Selain itu, gen CRT/DRE *bf* dilaporkan mengendalikan sifat toleransi terhadap cekaman kekeringan, suhu dingin, dan salinitas tinggi pada tanaman *Arabidopsis thaliana* dengan cara mengendalikan pembentukan asam absisat (ABA) (Shinozaki *et al.*, 2003). Tf MBF juga dilaporkan mengendalikan sifat toleran kering pada tanaman *Arabidopsis thaliana* dengan cara mengatur konduktansi stomata dan kadar air daun relatif (Rizhsky *et al.*, 2004). Sementara itu, gen GPX (Glutathione peroxidase) dilaporkan mengendalikan sifat toleransi terhadap kekeringan melalui aktivasi enzim GPX yang berperan dalam mendetoksifikasi ROS pada tanaman tembakau (Yoshimura *et al.*, 2004). Pada tanaman padi, gen SNAC1 dilaporkan mengendalikan sifat toleransi terhadap kekeringan dengan pengaturan bukaan stomata (Kuruvillea *et al.*, 2016). Selain itu, beberapa faktor transkripsi gen pengendali toleransi terhadap kekeringan seperti WRKY, bZIP, NAC, AP2 dan C2H2 (Karnatam *et al.*, 2020) dan LOC\_Os01g72800 dan LOC\_Os01g72950 (Punchkhon *et al.*, 2020) juga terdapat pada tanaman padi.

Pada tanaman karet, beberapa gen pengendali sifat toleransi terhadap kekeringan juga telah dilaporkan oleh beberapa peneliti. Luke *et al.* (2015), melaporkan bahwa *Mitogen*

*Activated Protein* (MAP) kinase, Myeloblastosis (Myb) *transcription factor*, *C-repeat responsive element/Dehydration Responsive Element* (CRT/DRE) *binding factor*, dan *Nuclear Factor Y subunit A* (NFYA) menunjukkan asosiasi yang positif terhadap sifat toleransi terhadap kekeringan. Gen Hb33HP, Hb22HP, dan Hb20HP juga dilaporkan mengendalikan sifat toleransi terhadap kekeringan pada tanaman karet (Thomas *et al.*, 2012). Wang (2014) juga menyebutkan bahwa beberapa gen seperti HbCuZnSOD, HbMnSOD, HbAPX, HbCAT,

HbCOA, HbATP, dan HbACAT mengendalikan sifat toleransi kekeringan pada tanaman karet dengan cara meregulasi pembentukan antioksidan pendetoksifikasi ROS. Selain itu, Leclercq *et al.* (2012) juga membuktikan bahwa over ekspresi dari gen HbCuZnSOD dan HbMnSOD dapat meningkatkan toleransi kekeringan tanaman karet klon PB 260. Selain itu, beberapa gen seperti peroxidase, WRKY transcription factor (WRKY) dan Late Embryogenesis Abundant 5 (LEA 5) protein dilaporkan juga mempunyai asosiasi yang kuat dengan toleransi terhadap

Tabel 2. Primer dari beberapa gen yang terasosiasi dengan sifat toleransi terhadap kekeringan

Gen	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Sumber Pustaka
MAPK	CTGTTGTGTGCA AGCAGGTTTT	CCCTATGTATGACA TGTCGCTCAT	Luke <i>et al.</i> , 2015
Myb tf	TGTGACCACTAGA ACACCAACTCA	TCCTGTGCTCTGCC TGATAAAA	Luke <i>et al.</i> , 2015
CRT/DRE bf	AGTCCCGGCATTG CAAAA	GAGTCAGCGCCGG AGGAT	Luke <i>et al.</i> , 2015
NFYA1	TTGGTGGGAAGGAT GTGTTTGC	ACTCCTCTGGTGGT CAGCTAGAA	Luke <i>et al.</i> , 2015
HbHP33	GGCCGTGCAATAC GTGAGA	GCCATTTTCTTCGC GTAAGG	Thomas <i>et al.</i> , 2012
HbHP22	CACCCCAACGAGT GACAACA	TGCTCAGAAGGTG GACTTTGC	Thomas <i>et al.</i> , 2012
HbHP20	CTCGACATCCCTT CGTTCCA	TTGGTGGCCTTGTA GGTGTTT	Thomas <i>et al.</i> , 2012
HbCuZnSOD	GTCCAACCACCGT AACTG	GCCATCATCACCAA CATTG	Wang, 2014
HbMnSOD	TGTGCTGTAATGT TGACCTA	GTTCACCTGTAAGT AGTATGC	Miao & Gaynor, 1993; Wang, 2014
HbAPX	CCAAGTACACCG TTCTT	CAGCACCATCCTCT ACATC	Mai <i>et al.</i> , 2009; Wang, 2014
HbCAT	GAGTATCCAGTTA GGCATCA	CTAGTGAATCATGT CCAAGTC	Wang, 2014
HbCOA	GGTGACATGGTG GTGAAT	TGAAGTGACGAAT GAGGTAA	Deng <i>et al.</i> , 2012; Wang, 2014
HbATP	GCTTCACGCAGAC TATTATC	TAGAGGATGGAGA TGAGGAA	Chye & Tan, 1992; Wang, 2014
HbACAT	GGTATTGTGGTTC CTGGTAT	ATGGTGATTGTTGT GATGAG	Wang, 2014

kekeringan pada karet (Kuruvilla *et al.*, 2016; Thomas *et al.*, 2012). Primer dari beberapa gen tersebut disajikan pada Tabel 2.

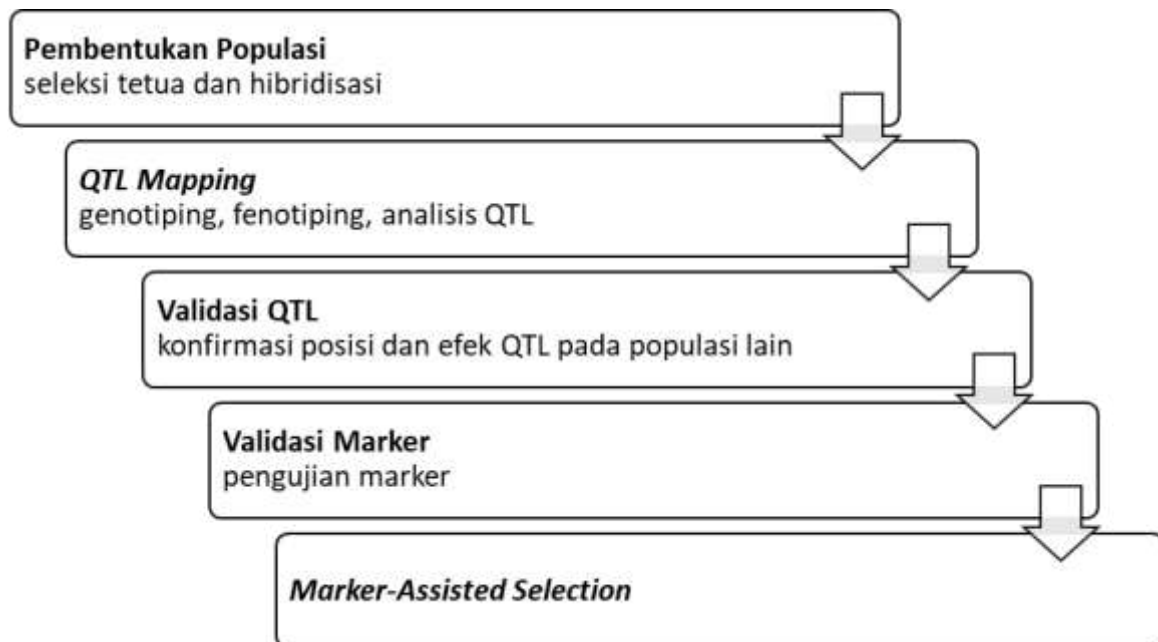
Untuk parameter DFI pada tanaman karet, belum terdapat laporan mengenai gen-gen yang mengendalikannya, sehingga untuk parameter tersebut saat ini baru terdapat publikasi mengenai QTL yang bertautan dengan sifat tersebut. Cahyo *et al.* (2022b) melaporkan bahwa QTL yang terasosiasi dengan parameter DFI terletak pada lokus g5TA2155, yang terdapat pada jarak 0,553 cM pada *linkage group* nomor 5. Penelitian tersebut masih perlu diteliti lebih dalam lagi untuk mengidentifikasi gen-gen yang terdapat pada lokus tersebut.

#### **Penerapan Metode MAS untuk Seleksi Klon Karet Toleran Cekaman Kekeringan**

Penerapan metode MAS dalam seleksi klon karet unggul berdasarkan parameter-parameter toleransi terhadap kekeringan ini sangat penting karena dapat mempercepat dan

meningkatkan akurasi seleksi. Untuk parameter sifat toleransi terhadap kekeringan, sampai saat ini belum ada laporan mengenai hasil seleksi klon karet toleran cekaman kekeringan dengan metode MAS. Diharapkan dengan menggunakan metode MAS, seleksi klon unggul tanaman karet dapat diselesaikan dalam jangka waktu kurang dari satu tahun (stadia awal pertumbuhan tanaman) (An *et al.*, 2019; Pootakham *et al.*, 2020; Priyadarshan, 2017; Xu & Crouch, 2008), apabila gen/kumpulan gen pengendali ekspresi suatu sifat telah diketahui dan telah divalidasi. Urutan kegiatan pemuliaan tanaman dalam menentukan marker untuk penerapan metode MAS disajikan dalam Gambar 1.

Gambar 1 menunjukkan bahwa tahapan kegiatan *marker-assisted selection* dimulai dari kegiatan pembentukan populasi hasil persilangan antar tetua yang mempunyai sifat yang diinginkan. Diharapkan bahwa gen yang diinginkan dari tetua diwariskan ke sebagian anggota populasi keturunannya (progeni). Gen pengendali sifat ini dapat berupa



Sumber: Collard & Mackill (2008)

Gambar 1. Tahap kegiatan pemuliaan tanaman dengan metode *marker-assisted selection*

gabungan beberapa gen yang saling mempengaruhi yang terdapat dalam suatu lokus dalam kromosom yang sering disebut dengan QTL.

QTL (*Quantitative Trait Loci*) (Geldermann, 1976; Kearsy, 1998), merupakan bagian DNA (lokus) yang terkait dengan variasi sifat kuantitatif dalam fenotip populasi. QTL dapat didefinisikan sebagai wilayah genom yang dikaitkan dengan efek pada sifat kuantitatif. Selain itu, QTL melibatkan gen tunggal atau sekelompok gen terkait yang mempengaruhi sifat tersebut. Sebelum penemuan penanda molekuler, QTL dikenal sebagai poligen (Kearsy, 1998). Karena konstruksi *saturated linkage map* dapat dibangun dengan teknologi marka molekuler, teknologi QTL dapat digunakan untuk melakukan analisis genetik yang bersifat kompleks. Informasi mengenai QTL ini berguna untuk program pemuliaan tanaman dengan metode *Marker-Assisted Selection* (Botstein *et al.*, 1980; Price *et al.*, 2002).

Terdapat tiga kegiatan yang perlu dilakukan untuk mengidentifikasi QTL, yaitu: a) kegiatan genotyping, b) kegiatan fenotyping, dan c) analisis statistik dengan perhitungan data genotyping dan fenotyping untuk menentukan signifikansi korelasi yang mungkin antara penanda genetik dan sifat agronomis tanaman atau dengan karakter yang menentukan tingkat toleransi (Gambar 1). Dari data QTL yang telah dihasilkan, dapat diidentifikasi gen-gen yang terkait dengan suatu sifat agronomis yang diinginkan. Oleh karena itu, *marker* genetik yang terkait dengan QTL dapat dimanfaatkan oleh pemulia tanaman untuk mempersingkat waktu yang dibutuhkan dalam seleksi tanaman (Clément-Demange *et al.*, 2006).

Perbaikan genetik tanaman untuk kemampuan adaptasi terhadap kekeringan merupakan tantangan karena kompleksitas sifat dan mekanisme molekuler dan fisiologis yang terkait dengan kekeringan (Ghimire *et al.*, 2012). Toleransi terhadap kekeringan dianggap sebagai sifat kompleks karena mekanisme toleransi kekeringan diatur oleh beberapa QTL, seperti mekanisme toleransi kekeringan, penghindaran, dan pemulihan (Kim *et al.*, 2017).

Gambar 1 juga menunjukkan bahwa setelah QTL yang berisi gen-gen pengendali sifat tahan cekaman kekeringan ditemukan, masih diperlukan validasi QTL dan gen-gen di dalamnya untuk mengkonfirmasi bahwa QTL dan gen-gen yang dimaksud adalah benar-benar mengendalikan sifat toleransi terhadap kekeringan. Validasi ini penting untuk dilakukan karena bisa saja posisi QTL dan efeknya bisa tidak akurat karena faktor bias saat dilakukan sampling. Kegiatan validasi ini dapat dilakukan pada populasi yang berbeda untuk mengkonfirmasi bahwa QTL tersebut juga efektif pada populasi lain dengan latar belakang genetik yang berbeda.

Apabila semua tahap dalam Gambar 1 telah selesai dilakukan, kegiatan seleksi klon karet yang toleran cekaman kekeringan dapat dilakukan dengan metode MAS, sehingga durasi waktu pemuliaan tanaman karet konvensional yang memerlukan waktu antara 35 hingga 40 tahun diharapkan dapat diperpendek menjadi kurang dari satu tahun. Hal ini dapat terjadi karena sifat genetik tanaman (termasuk gen-gen pembawa sifat toleransi klon karet terhadap kekeringan), dapat diidentifikasi dengan metode MAS sejak tanaman baru berkecambah dan mengeluarkan beberapa daun pertamanya ketika tanaman berumur beberapa minggu. Oleh karena itu, metode MAS ini sangat penting bagi program pemuliaan tanaman karet terutama untuk seleksi klon karet toleran kekeringan.

## Kesimpulan

Salah satu sifat klon karet unggul yang mendesak untuk diseleksi adalah sifat toleransi terhadap cekaman kekeringan. Permasalahan lamanya waktu pemuliaan tanaman karet dengan metode konvensional dapat diatasi dengan metode MAS. Untuk dapat menjalankan metode MAS, diperlukan identifikasi marker gen-gen yang terdapat dalam QTL yang terasosiasi dengan sifat fenotip yang diinginkan pemulia tanaman. Untuk itu, diperlukan beberapa tahapan kegiatan sebelum metode MAS ini dapat dilaksanakan, antara lain: pembentukan



populasi, pemetaan QTL, validasi QTL, dan validasi marker. Dengan metode MAS, durasi waktu pemuliaan tanaman karet yang membutuhkan waktu sekitar 35 hingga 40 tahun diharapkan dapat dipangkas menjadi kurang dari satu tahun.

#### Daftar Pustaka

- Ahmad, P., Jaleel, C. A., Azooz, M. M., & Nabi, G. (2009). Generation of ros and non-enzymatic antioxidants during abiotic stress in plants. *Botany Research International*, 2(1), 11–20.
- Ahmad, P., Sarwat, M., & Sharma, S. (2008). Reactive oxygen species, antioxidants and signaling in plants. *Journal of Plant Biology*, 51(3), 167–173. <https://doi.org/10.1007/BF03030694>
- Akram, N. A., Shafiq, F., & Ashraf, M. (2017). Ascorbic acid-a potential oxidant scavenger and its role in plant development and abiotic stress tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 8(613), 1–17.
- An, Z., Zhao, Y., Zhang, X., Huang, X., Hu, Y., Cheng, H., Li, X., & Huang, H. (2019). A high-density genetic map and QTL mapping on growth and latex yield-related traits in *Hevea brasiliensis* Müll.Arg. *Industrial Crops and Products*, 132, 440–448. doi: 10.1016/j.indcrop.2019.03.002.
- Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M., & Davis, R. W. (1980). Construction of a Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphisms. *American Society of Human Genetics*, 32, 314–331.
- Boureima, S., Oukarroum, A., Diouf, M., Cisse, N., & Van Damme, P. (2012). Screening for drought tolerance in mutant germplasm of sesame (*Sesamum indicum*) probing by chlorophyll a fluorescence. *Environmental and Experimental Botany*, 81, 37–43. doi: 10.1016/j.envexpbot.2012.02.015.
- Cahyo, A. N., Murti, R. H., Putra, E. T. S., Oktavia, F., Ismawanto, S., & Montoro, P. (2022a). Rubber Genotypes with Contrasting Drought Factor Index Revealed Different Mechanisms for Drought Resistance in *Hevea brasiliensis*. *Plants*, 11(24), 3563. doi: 10.3390/plants11243563.
- Cahyo, A. N., Murti, R. H., Putra, E. T. S., Oktavia, F., Ismawanto, S., Mournet, P., Fabre, D., & Montoro, P. (2022b). Screening and QTLs detection for drought factor index trait in rubber (*Hevea brasiliensis* Müll. Arg.). *Industrial Crops and Products*, 190, 115894. doi:10.1016/j.indcrop.2022.115894.
- Ceulemans, R., Gabriels, R., & Impens, I. (1984). Comparative study of photosynthesis in several *hevea brasiliensis* clones and *hevea* species under tropical field conditions. *Tropical Agriculture (Trinidad)*, 61(4), 273–275.
- Chaves, M. M., Flexas, J., & Pinheiro, C. (2009). Photosynthesis under drought and salt stress: Regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany*, 103(4), 551–560. doi: 10.1093/aob/mcn125.
- Chye, M.-L., & Tan, C.-T. (1992). Isolation and nucleotide sequence of a cDNA clone encoding the beta subunit of mitochondrial ATP synthase from *Hevea brasiliensis*. *Plant Molecular Biology*, 18(3), 611-612. doi: 10.1007/BF00040680.
- Çiçek, N., & Arslan, Ö. (2015). Are the photosynthetic performance indexes and the drought factor index satisfactory selection criterion for stress? *Fresenius Environmental Bulletin*, 24(11), 4190–4198.
- Clément-Demange, A., Prapan, K., Ratanawong, R., & Teerawatanasuk, K. (2006, June 1-2). Molecular genetic markers and rubber breeding in Thailand 2 – Field study of the family RRIM600 x PB217 for QTL identification. Tulisan disajikan pada The Conference of Thai-French Rubber Cooperation 2005-2008: “Towards the Improvement of Rubber Tree Productivity”. Bangkok

- Collard, B. C. Y., & Mackill, D. J. (2008). Marker-assisted selection: An approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 363(1491), 557–572. doi:10.1098/rstb.2007.2170.
- de Raissac, M., Perez, R., & Fabre, D. (2017). New challenges in oil palm phenotyping in relation to climate. In A. C. Soh, S. Mayes, & J. Roberts (Ed.), *Oil Palm Breeding, Genetics and Genomics* (p. 446). Abingdon, UK: CRC Press, Taylor & Francis Group, LLC.
- Deng, L. H., Luo, M.W., Zhang, C.F., & Zeng, H. C. (2012). Extraction of high-quality RNA from rubber tree leaves. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 76(7), 1394–1396. doi:10.1271/bbb.120014.
- Dionisio-Sese, M. L., & Tobita, S. (1998). Antioxidant responses of rice seedlings to salinity stress. *Plant Science*, 135(1), Article 1. doi:10.1016/S0168-9452(98)00025-9.
- Falqueto, A. R., da Silva Júnior, R. A., Gomes, M. T. G., Martins, J. P. R., Silva, D. M., & Partelli, F. L. (2017). Effects of drought stress on chlorophyll a fluorescence in two rubber tree clones. *Scientia Horticulturae*, 224, 238–243. doi:10.1016/j.scienta.2017.06.019.
- Fikret, Y., Manar, T., ebne, E., ebne, K., & Özlem, U. (2013). SOD, CAT, GR and APX enzyme activities in callus tissues of susceptible and tolerant eggplant varieties under salt stress. *Research Journal of Biotechnology*, 8(11), 45–51.
- Foyer, C. H., & Noctor, G. (2000). Tansley review no. 112: oxygen processing in photosynthesis: regulation and signalling. *New Phytologist*, 146(3), 359–388. doi:10.1046/j.1469-8137.2000.00667.x
- Foyer, C. H., & Noctor, G. (2003). Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiologia Plantarum*, 119(3), Article 3. doi:10.1034/j.1399-3054.2003.00223.x.
- Geldermann, H. (1976). Investigations on inheritance of quantitative characters in animals by gene markers ii. expected effects. *Theoretical and Applied Genetics*, 47(1), 1–4. doi:10.1007/BF00277397.
- Ghimire, K. H., Quiatchon, L. A., Vikram, P., Swamy, B. P. M., Dixit, S., Ahmed, H., Hernandez, J. E., Borrromeo, T. H., & Kumar, A. (2012). Identification and mapping of a QTL (qDTY1.1) with a consistent effect on grain yield under drought. *Field Crops Research*, 131, 88–96. doi:10.1016/j.fcr.2012.02.028.
- Halliwell, B. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*, 141(2), 312–322. doi:10.1104/pp.106.077073.
- Hamim, H., Violita, V., Triadiati, T., & Miftahudin, M. (2017). Oxidative stress and photosynthesis reduction of cultivated (glycine max l.) And wild soybean (g. Tomentella l.) Exposed to drought and paraquat. *Asian Journal of Plant Sciences*, 16(2), 65–77. doi:10.3923/ajps.2017.65.77.
- Heidari, M. (2009). Antioxidant activity and osmolyte concentration of sorghum (sorghum bicolor) and wheat (triticum aestivum) genotypes under salinity stress. *Asian Journal of Plant Sciences*, 8(3), 240–244. doi:10.3923/ajps.2009.240.244.
- Indraty, I. S. (2003). The endurance of rubber planting material clones planted in polybags on the drought condition. *Indonesian Journal of Natural Rubber Research*, 21(1–3), 12–24.
- Intergovernmental Panel on Climate Change. (2018). Summary for Policymakers.

- In V. Masson-Delmotte, P. Zhai, H. O. Pörtner, D. Roberts, J. Skea, P. R. Shukla, A. Pirani, W. Moufouma-Okia, C. Péan, R. Pidcock, S. Connors, J. B. R. Matthews, Y. Chen, X. Zhou, M. I. Gomis, E. Lonnoy, T. Maycock, M. Tignor, & T. Waterfield (Ed.), Global warming of 1.5°C. An IPCC Special Report on the impacts of global warming of 1.5°C above pre-industrial levels and related global greenhouse gas emission pathways, in the context of strengthening the global response to the threat of climate change, sustainable development, and efforts to eradicate poverty (p. 32). Geneva, Switzerland : World Meteorological Organization.
- Kalaji, H. M., Jajoo, A., Oukarroum, A., Brestic, M., Zivcak, M., Samborska, I. A., Cetner, M. D., ukasik, I., Goltsev, V., & Ladle, R. J. (2016). Chlorophyll a fluorescence as a tool to monitor physiological status of plants under abiotic stress conditions. *Acta Physiologiae Plantarum*, 38(102), 1–11. doi: 10.1007/s11738-016-2113-y.
- Karnatam, K. S., Jaganathan, D., Dilip, K. R., Boopathi N, M., & Muthurajan, R. (2020). Shortlisting putative candidate genes underlying qDTY1.1, a major effect drought tolerant QTL in rice (*Oryza sativa* L.). *Electronic Journal of Plant Breeding*, 11(03), 916–924. doi: 10.37992/2020.1103.149
- Karyudi. (2001). Osmoregulasi tanaman karet sebagai respons terhadap cekaman air I: variasi diantara klon anjuran, harapan dan plasma nutfah. *Indonesian Journal of Natural Rubber Research*, 19(1–3), 1-17.
- Kataria, S. (2017). Oxidative Stress and Antioxidative Defence System in Plants in Response to UV B Stress. In V. P. Singh, S. Singh, S. M. Prasad, & P. Parihar (Ed.), *UV-B Radiation: From Environmental Stressor to Regulator of Plant Growth* (1st ed., pp. 99–122). New Jersey, USA : John Wiley & Sons, Ltd.
- Kearsey, M. J. (1998). The principles of QTL analysis (a minimal mathematics approach). *Journal of Experimental Botany*, 49(327), 1619–1623.
- Kholová, J., Hash, C. T., Ko ová, M., & Vadez, V. (2011). Does a terminal drought tolerance QTL contribute to differences in ROS scavenging enzymes and photosynthetic pigments in pearl millet exposed to drought?. *Environmental and Experimental Botany*, 71(1), 99–106. doi: 10.1016/j.envexpbot.2010.11.001.
- Kim, T.-H., Hur, Y.-J., Han, S.-I., Cho, J.-H., Kim, K.-M., Lee, J.-H., Song, Y.-C., Kwon, Y.-U., & Shin, D. (2017). Drought-tolerant QTL qVDT11 leads to stable tiller formation under drought stress conditions in rice. *Plant Science*, 256, 131–138. doi: 10.1016/j.plantsci.2016.11.008.
- Krishan, B. (2017). Assessment of drought tolerance in few clones of natural rubber (*Hevea brasiliensis*) under dry hot climate of Odisha, India. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*, 5(1), 106–110. doi: 10.18006/2017.5(1).106.110.
- Kuruville, L., Sathik, M. B. M., Thomas, M., Luke, L. P., Sumesh, K. V., & Annamalainathan, K. (2016). Expression of miRNAs of *Hevea brasiliensis* under drought stress is altered in clones with varying levels of drought tolerance. *Indian Journal of Biotechnology*, 15(2), 153-160.
- Leclercq, J., Martin, F., Sanier, C., Clément-Vidal, A., Fabre, D., Oliver, G., Lardet, L., Ayar, A., Peyramard, M., & Montoro, P. (2012). Over-expression of a cytosolic isoform of the HbCuZnSOD gene in *Hevea brasiliensis* changes its response to a water deficit. *Plant Molecular Biology*, 80(3), 255-272. doi: 10.1007/s11103-012-9942-x.
- Liu, J.-P., Zhuang, Y.-F., Guo, X.-L., & Li, Y.-J. (2016). Molecular mechanism of ethylene stimulation of latex yield in rubber tree (*Hevea brasiliensis*) revealed by de novo sequencing and transcriptome analysis. *BMC Genomics*, 17(1), 257. doi: 10.1186/s12864-016-2587-4.

- Luke, L. P., Sathik, M. B. M., Thomas, M., Kuruvilla, L., Sumesh, K. V., & Annamalainathan, K. (2015). Quantitative expression analysis of drought responsive genes in clones of Hevea with varying levels of drought tolerance. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 21(2), 179-186. doi: 10.1007/s12298-015-0288-0.
- Mai, J., Herbette, S., Vandame, M., Kositsup, B., Kasemsap, P., Cavaloc, E., Julien, J.-L., Améglio, T., & Roedel-Drevet, P. (2009). Effect of chilling on photosynthesis and antioxidant enzymes in Hevea brasiliensis. *Muell. Arg. Trees*, 23(4), 863-874. doi: 10.1007/s00468-009-0328-x.
- Mazid, M., Khan, T. A., Khan, Z. H., Quddusi, S., & Mohammad, F. (2011). Occurrence, Biosynthesis and Potentialities of Ascorbic Acid in Plants. *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences*, 1(2), 167-184.
- Miao, Z., & Gaynor, J. J. (1993). Molecular cloning, characterization and expression of Mn-superoxide dismutase from the rubber tree (Hevea brasiliensis). *Plant Molecular Biology*, 23(2), 267-277. doi: 10.1007/BF00029003.
- Møller, I. M. (2001). Plant mitochondria and oxidative antioxidant capacity and resistance to stress: electron transport, nadph turnover and photoinhibition in poplar trees. *Plant physiol., metabolism of reactive oxygen species. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52(1), 561-591. doi: 10.1146/annurev.arplant.52.1.561.
- Mueller, M. J. (2004). Archetype signals in plants: The phytoprostanes. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(4), 441-448. doi: 10.1016/j.pbi.2004.04.001.
- Oukarroum, A., Madidi, S. E., Schansker, G., & Strasser, R. J. (2007). Probing the responses of barley cultivars (Hordeum vulgare L.) by chlorophyll a fluorescence OLKJIP under drought stress and re-watering. *Environmental and Experimental Botany*, 60(3), 438-446. doi: 10.1016/j.envexpbot.2007.01.002.
- Patil, H. E., Mahatma, M. K., Patel, N. J., Bhatnagar, R., & Jadeja, G. C. (2005). Differential response of pearl millet hybrids to water stress in relation to antioxidant enzymes and proline. *Indian Journal of Plant Physiology*, 10(4), 344-348.
- Pootakham, W., Shearman, J. R., & Tangphatsornruang, S. (2020). Development of Molecular Markers in Hevea brasiliensis for Marker-Assisted Breeding. In M. Matsui & K.-S. Chow (Ed.), *The Rubber Tree Genome* (pp. 67-79). New York, USA : Springer International Publishing.
- Price, A. H., Cairns, J. E., Horton, P., Jones, H. G., & Griffiths, H. (2002). Linking drought resistance mechanisms to drought avoidance in upland rice using a QTL approach: Progress and new opportunities to integrate stomatal and mesophyll responses. *Journal of Experimental Botany*, 53(371), 989-1004. doi: 10.1093/jexbot/53.371.989.
- Priyadarshan, P. M. (2017). *Biology of Hevea Rubber*. Berlin , Germany : Springer Science+Business Media.
- Prochazkova, D., Sairam, R. K., Srivastava, G. C., & Singh, D. V. (2001). Oxidative stress and antioxidant activity as the basis of senescence in maize leaves. *Plant Science*, 161(4), 765-771. doi: 10.1016/S0168-9452(01)00462-9.
- Punchkhon, C., Plaimas, K., Buaboocha, T., Siangliw, J. L., Toojinda, T., Comai, L., De Diego, N., Spíchal, L., & Chadchawan, S. (2020). Drought-tolerance gene identification using genome comparison and co-expression network analysis of chromosome substitution lines in rice. *Genes*, 11(10), 1197. doi:10.3390/genes11101197.

- Rizhsky, L., Liang, H., Shuman, J., Shulaev, V., Davletova, S., & Mittler, R. (2004). When defense pathways collide. The response of Arabidopsis to a combination of drought and heat stress. *Plant Physiology*, 134(4), 1683–1696. doi: 10.1104/pp.103.033431.
- Sanier, C., Oliver, G., Clément-Vidal, A., Fabre, D., Lardet, L., & Montoro, P. (2013). Influence of water deficit on the physiological and biochemical parameters of in vitro plants from *Hevea brasiliensis* clone PB 260. *Journal of Rubber Research*, 16(1), 61–74.
- Santos, J. O. dos, Oliveira, L. E. M. de, Souza, T. de, Lopes, G. M., Coelho, V. T., & Gomes, M. P. (2019). Physiological mechanisms responsible for tolerance to, and recuperation from, drought conditions in four different rubber clones. *Industrial Crops and Products*, 141, 111714. doi:10.1016/j.indcrop.2019.111714.
- Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Seki, M. (2003). Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Current Opinion in Plant Biology*, 6(5), 410–417. doi.org/10.1016/S1369-5266(03)00092-X
- Silva, P. E. M., Cavatte, P. C., Morais, L. E., Medina, E. F., & DaMatta, F. M. (2013). The functional divergence of biomass partitioning, carbon gain and water use in *coffea canephora* in response to the water supply: implications for breeding aimed at improving drought tolerance. *Environmental and Experimental Botany*, 87, 49–57. doi: 10.1016/j.envexpbot.2012.09.005.
- Stirbet, A., Lazár, D., Kromdijk, J., & Govindjee. (2018). Chlorophyll a fluorescence induction: can just a one-second measurement be used to quantify abiotic stress responses? *Photosynthetica*, 56(1), 86–104. doi: 10.1007/s11099-018-0770-3.
- Strasser, R. J., Tsimilli-Michael, M., & Srivastava, A. (2004). Analysis of the Chlorophyll a Fluorescence Transient. In G. C. Papageorgiou & Govindjee (Eds.), *Chlorophyll a Fluorescence* (Vol. 19, pp. 321–362). Dordrecht, Netherland : Springer Netherlands.
- Strauss, A. J., Krüger, G. H. J., Strasser, R. J., & Heerden, P. D. R. V. (2006). Ranking of dark chilling tolerance in soybean genotypes probed by the chlorophyll a fluorescence transient O-J-I-P. *Environmental and Experimental Botany*, 56(2), 147–157. doi: 10.1016/j.envexpbot.2005.01.011.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2002). *Plant physiology* (3rd ed.). Sunderland, USA: Sinauer Associates.
- Thomas, M., Thiruvithamkottil, M. sathik, Luke, L. P., Sumesh, K. V., Satheesh, P. R., Annamalaiathan, K., & Jacob, J. (2012). Stress responsive transcripts and their association with drought tolerance in *Hevea brasiliensis*. *Journal of Plantation Crops*, 40, 180–187.
- Thomas, M., Xavier, S. M., Sumesh, K. V., Annamalaiathan, K., Nair, D. B., & Mercy, M. A. (2015). Identification of potential drought tolerant hevea germplasm accessions using physiological and biochemical parameters. *Rubber Science*, 28(1), 62–69.
- Velázquez-Márquez, S., Conde-Martínez, V., Trejo, C., Delgado-Alvarado, A., Carballo, A., Suárez, R., Mascorro, J. O., & Trujillo, A. R. (2015). Effects of water deficit on radicle apex elongation and solute accumulation in *Zea mays* L. *Plant Physiology and Biochemistry*, 96, 29–37. doi: 10.1016/j.plaphy.2015.07.006.

- Vicuna Requesens, D., Malone, R., & Dix, P. (2012). Increased tolerance to abiotic stresses in tobacco plants expressing a barley cell wall peroxidase. *Journal of Plant Sciences*, 6, 1 – 13 . doi:10.3923/jps.2011.1.13.
- Vijayakumar, K. R., Dey, S. K., Chandrasekhar, T. R., Devakumar, A. S., Mohankrishna, T., Rao, P. S., & Sethuraj, M. R. (1998). Irrigation requirement of rubber trees *Hevea brasiliensis* in the subhumid tropics. *Agricultural Water Management*, 35(3), 245–259.
- Wang, L. (2014). Physiological and molecular responses to drought stress in rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 83, 243–249. doi: 10.1016/j.plaphy.2014.08.012.
- Wang, Z., Li, G., Sun, H., Ma, L., Guo, Y., Zhao, Z., Gao, H., & Mei, L. (2018). Effects of drought stress on photosynthesis and photosynthetic electron transport chain in young apple tree leaves. *Biology Open*, 7(11), bio035279 . doi:10.1242/bio.035279.
- Xavier, S. M., Thomas, M., Sumesh, K. V., & Annamalainathan, K. (2018). Drought induced changes in leaf pigments and osmolyte contents in hevea germplasm accessions. *Indian Journal of Scientific Research*, 19(1), 61–67.
- Xu, Y., & Crouch, J. H. (2008). Marker-assisted selection in plant breeding: from publications to practice. *Crop Science*, 48(2), 391 - 407 . doi: 10.2135/cropsci2007.04.0191.
- Yoshimura, K., Miyao, K., Gaber, A., Takeda, T., Kanaboshi, H., Miyasaka, H., & Shigeoka, S. (2004). Enhancement of stress tolerance in transgenic tobacco plants overexpressing *Chlamydomonas* glutathione peroxidase in chloroplasts or cytosol. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 37(1), 21–33. doi: 10.1046/j.1365-313x.2003.01930.x.