

## VARIASI NUKLEOTIDA PADA GEN *TREHALOSE 6 PHOSPHATE PHOSPHATASE* PADA VARIETAS PADI *JAPONICA*

Ifa Manzila, Puji Lestari dan Tri Puji Priyatno

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan  
Sumber Daya Genetik Pertanian  
Jl. Tentara Pelajar No. 3A Cimanggu Bogor 16111  
Korespondensi: ifamanzila@gmail.com

### ABSTRAK

*Trehalose 6 phosphate phosphatase* (T6PP) merupakan salah satu gen yang berperan dalam melindungi tanaman dari cekaman abiotik dan biotik. Sampai saat ini T6PP belum banyak diteliti level genetiknya pada plasma nutfah padi. Studi ini bertujuan untuk mengidentifikasi variasi nukleotida pada sikuen parsial gen T6PP dan hubungan kekerabatan antara varietas padi *japonica* berdasarkan gen tersebut. Dua primer didisain untuk mengamplifikasi T6PP terutama pada posisi 5865949-25866935 bp dan 25868041-25868967 bp dan dideteksi variasinya pada 12 varietas padi *japonica* yang sebagian besar berasal dari Korea Selatan menggunakan *TA cloning* yang dibandingkan dengan sikuen kultivar rujukan, Nipponbare. Analisis filogenetik juga dilakukan untuk mengetahui keragaman genetik 12 varietas padi tersebut. Hasilnya menunjukkan bahwa sebagian besar mutasi terjadi di intron (daerah non-koding). Sejumlah insersi dan delesi sedikitnya satu basa ditemukan sepanjang sikuen parsial T6PP. Perubahan basa seperti transversi didominasi T/G dan A/G, sementara transisi sebagian besar adalah T/C, C/T dan A/G. Pola polimorfisme ditemukan pada posisi yang sama pada beberapa varietas yang menunjukkan kedekatan genetik di antara mereka. Pohon filogeni menghasilkan tiga kluster utama yaitu kultivar padi *japonica* rujukan (Nipponbare), varietas premium Jepang (Koshihikari), dan seluruh varietas *japonica* asal Korea Selatan dalam satu grup. Beberapa varietas mempunyai kedekatan dibandingkan lainnya, seperti pada Dongjin dan Hwacheong, dan Dobong dan Samnam. Variasi dalam T6PP merupakan sumber penting untuk pengembangan marka molekuler berdasarkan gen T6PP yang dapat diaplikasikan pada padi *japonica*.

**Kata kunci** : padi *japonica*, *trehalose 6 phosphate phosphatase*, keragaman genetik, variasi nukleotida

### PENDAHULUAN

Padi yang merupakan makanan pokok lebih dari setengah populasi dunia, masih perlu dikembangkan genetiknya melalui program pemuliaan untuk memenuhi kebutuhan pangan. Meskipun jenis *indica* populer di seluruh dunia, tetapi negara-negara seperti Asia timur laut seperti Korea, Jepang, Cina Utara dan Taiwan lebih menyukai padi *japonica*. Dalam usaha meningkatkan produktivitas, cekaman

biotik maupun abiotik merupakan masalah yang dihadapi pada budidaya padi di dunia termasuk Asia. Kondisi tersebut secara meluas dapat menyebabkan kerusakan utama tanamana padi di berbagai sentra produksi beras.

Padi *japonica* yang cenderung memiliki karakter gabah lebih pendek dan pulen dari pada *indica*, tidak lepas dari serangan hama dan penyakit maupun cekaman lingkungan. Akibat kondisi lingkungan tersebut, produksi padi *japonica* menurun dan memerlukan strategi khusus pemuliaan di negara-negara penghasil *japonica*. Di Indonesia yang memiliki kultur yang berbeda disetiap daerahnya memerlukan beras yang memiliki tektur dan citarasa pulen yang dimiliki *japonica*. Sehingga dari penelitian ini diharapkan akan diperoleh padi *japonica* yang mengandung T6PP yang berperan dalam melindungi tanaman dari cekaman abiotik dan biotik serta dapat digunakan sebagai tetua. Sampai saat ini T6PP belum banyak diteliti level genetiknya pada plasma nutfah padi. Di negara-negara subtropik, kondisi dingin maupun hama penyakit tertentu yang endemik dapat menjadi kendala utama produksi padi nasional. Pada kondisi yang optimum untuk perkembangan hama dan penyakit, serangannya dapat menyebabkan kerusakan yang sangat parah dan kehilangan hasil lebih dari 85% (<http://www.knowledgebank.irri.org>). Penggunaan varietas tahan yang bersifat *durable resistance* dan *wide adaptability* mampu melindungi tanaman dalam jangka waktu lama serta dalam skala geografis yang luas. Karena itu, peningkatan ketahanan terhadap cekaman abiotik dan biotik menjadi salah satu tujuan utama pemuliaan di Korea Selatan. Sumber plasma nutfah baik *landrace* maupun kultivar yang ada dimanfaatkan untuk pengembangan kultivar baru sebagai respon terhadap perubahan lingkungan (NASTI 1996; Khaing et al., 2014).

Karbohidrat diketahui mempunyai fungsi sangat bervariasi dan penting sebagai komponen sel tanaman, termasuk sistem *defence* tanaman karena cekaman lingkungan. Beberapa *signaling pathway* yang mengintegrasikan respon gula telah diidentifikasi. Salah satu *pathway* melibatkan sintesis, persepsi dan respon disakarida non-reduksi, *trehalose*. *Trehalose* sebenarnya banyak ditemukan pada actinomycetes, serangga, cendawan dan invertebrata (Elbein et al., 2003), namun demikian disakarida tersebut juga ditemukan pada tanaman terkait dengan sistem ketahanan (Jain dan Roy, 2010). *Trehalose* juga berfungsi sebagai sumber karbon serta *osmoprotectant*.

Beberapa penelitian menggunakan tanaman mutan mengungkapkan pentingnya metabolisme *trehalose* dalam pengendalian perkembangan tanaman (Avonce et al., 2004 ; Lunn et al., 2007 ; Eastmond et al., 2002; Gomez et al., 2006; Satoh-Nagasawa et al., 2006; van Dijken et al., 2004). Menariknya, sejumlah besar gen yang diduga pengkodean enzim sintesis *trehalose* ditemukan dalam genom tanaman yang lebih tinggi (Avonce et al., 2006; Lunn, 2007). Diketahui bahwa biosintesis *trehalose* melibatkan *trehalose-6-phosphate phosphatase* (T6PP), khususnya dalam defosforilasi *trehalose 6 phosphate* menjadi *trehalose*. Pada tanaman, T6PP diketahui berperan dalam melindungi tanaman dari cekaman abiotik dan biotik (Ponnu et al., 2011), termasuk di padi.

Mengingat perannya pada tanaman cukup penting (Harthill et al., 2006; Shima et al., 2007) studi gen T6PP perlu dilakukan. Apalagi sampai saat ini, T6PP belum banyak diteliti fungsi dan variasinya pada plasma nutfah padi terkait ketahanannya terhadap cekaman lingkungan. Marka yang didisain dari variasi dalam gen atau genom telah terbukti bermanfaat untuk membantu proses seleksi berbagai varietas padi (Garland et al., 2000), termasuk T6PP. Informasi awal kekerabatan genetik pada aksesi/varietas padi akan sangat membantu dalam skrining tetua persilangan dalam program pemuliaan untuk karakter yang dikontrol oleh gen T6PP. Karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi variasi nukleotida pada sikuen parsial gen T6PP dan hubungan kekerabatan genetik 12 varietas padi *japonica* yang berasal dari Korea Selatan berdasarkan gen tersebut.

## BAHAN DAN METODE

### Materi Genetik dan Isolasi DNA

Sebanyak 12 varietas padi *japonica* yang terdiri dari 11 varietas dari Korea (Kopum, Samkwang, Ilpum, Chucheong, Dongjin, Sinkemo, Hwaseong, Hwacheong, Dobong, Samnam dan Palkong) dan satu kultivar dari Jepang (Koshihikari) digunakan pada penelitian ini. Padi ditanam di rumah kaca sekitar 1 bulan, kemudian dipilih daun sehat dan muda untuk isolasi DNA total genomiknya.

Isolasi DNA dilakukan berdasarkan metode CTAB menurut Murray dan Thompson (1980). DNA dilarutkan dalam 50 µl buffer TE. Kualitas dan kuantitas DNA ditentukan menggunakan Nano DropR ND-1000 Spectrophotometer (Nano Drop, Willington, Delaware, USA), dimigrasikan pada gel agarose 0.8% dan DNA divisualisasikan di atas transiluminator UV.

### Amplifikasi Polymerase Chain Reaction (PCR), TA Cloning dan Sikuensing

Sikuen primer TreA didisain berasal dari segmen *Trehalose 6 Phosphate phosphatase* yang berlokasi pada kromosom 7 (clone AP004341). Daerah *Trehalose* yang diamplifikasi pada posisi 25865949 - 25866935 bp dan 25868041 - 25868967 bp dengan disain primer masing-masing TreA dan TreB. Susunan sekuen primer TreA adalah F: 5'-TCTCTCTCCCTGTTTCGTCGT-3' dan R: 5'-AGTCCTCCAGCTTCACAAA-3'. Dan primer TreB adalah F: 5'-CACTCCAGTTCCTGCTCAAAA-3' dan R: 5'-TGCACTTGCAACAACTCTC-3'. Disain primer menggunakan program PRIMER3 (<http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3>) (Rozen and Skaletsky 2000). Reaksi PCR dilakukan dalam total volume 50 µl yang terdiri dari 2 µl DNA 20 ng/µl, 10X bafer mengandung 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 µl 2.5 mM dNTPs, 1 U Ex Takara Taq Polymerase (Takara Bio, Inc. Jepang) dan masing-masing 1 µl primer forward dan reverse (10 uM). Program PCR dilakukan dengan 95 °C selama 10 detik, 55 °C selama 30 detik dan 72 °C selama 1 menit dengan total 35 siklus. Pita tunggal produk PCR dipurifikasi dan di-*TA cloning* ke dalam vektor pGEM-TEasy dan kemudian ditransformasi ke dalam sel kompeten *Escherichia coli* DH5α

(Sambrook dan Russell 2001). Plasmid diisolasi menggunakan kit DNA-spin Plasmid DNA Purification (Intron Biotechnology, Korea) kemudian disekuensing dengan mesin Sequencer ABI3700.

### Analisis Data

Sikuen hasil amplifikasi primer TreA dan TreB *dialignment* dengan BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioEdit/nioedit.html>) untuk mengetahui variasi nukleotidanya. Variasi *single nucleotide polymorphism* (SNP) dan insersi/delesi (indel) digunakan sebagai dasar jarak antar varietas padi untuk dibuat pohon filogeni *neighbor joining* dengan MEGA 4.0. Multiple bootstrap hasil penjabaran sikuen dibuat dalam 1000 ulangan (Ching et al. 2002; Tamura et al., 2007).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Dalam studi ini, gen kandidat *trehalose-6-phosphate phosphatase* (T6PP) diidentifikasi berdasarkan hasil analisis *quantitative trait loci* (QTL) terkait kualitas biji padi dan ketahanan terhadap penyakit dengan menggunakan populasi *japonica* (Kwon et al., 2008a, 2008b). Diantara gen-gen kandidat terkait QTL, diketahui gen yang terlibat dalam sintesis *trehalose* berada diantara marka molekuler pengapit yang berada di kromosom 7. Jenis disakarida *trehalose*, banyak terlibat dalam sistem ketahanan (*defence*) di tanaman (Ponnu et al., 2011), sehingga disakarida ini memegang peranan penting bagi pertumbuhan dan produksi tanaman. Karena itu, gen kandidat T6PP selanjutnya diseleksi untuk diamplifikasi. Gen kandidat T6PP pada kromosom 7 (clone AP004341) sepanjang 4020 bp diketahui terletak antara 25865517-25869537 bp dalam genom padi.

Dua primer masing-masing TreA dan TreB berhasil mengamplifikasi fragmen masing-masing pada posisi 25865949-25866935 bp dan 25868041-25868967 bp dari T6PP pada 11 varietas *japonica* berasal dari Korea Selatan dan satu varietas dari Jepang. Nipponbare yang merupakan kultivar rujukan *japonica* digunakan sebagai rujukan untuk menentukan variasi nukleotida sebagai dasar uji kekerabatan genetik varietas padi *japonica* dalam studi ini. SNP dan indel pada sikuen parsial T6PP yang diobservasi dalam 12 varietas padi *japonica* ditampilkan pada Tabel 1. Hasil penelitian menunjukkan bahwa sebagian besar mutasi terjadi di intron (daerah non-koding). Mutasi di daerah koding (exon) lebih banyak mendapat perhatian karena hubungannya dengan perubahan asam amino dan fenotipnya. Namun demikian, SNP di intron tidak menghasilkan perubahan produk gen. Hasil ini relevan dengan laporan sebelumnya bahwa mutasi di daerah non-koding frekuensinya lebih tinggi daripada di daerah koding (Barreiro et al., 2008).

Sejumlah insersi dan delesi minimal satu basa ditemukan sepanjang sikuen parsial T6PP. Perubahan basa tunggal umumnya adalah transisi dan transversi, jenis mutasi gen transisi merupakan substitusi dari pirimidin ke pirimidin (C atau T) atau purin ke purin (A atau G). Sedangkan transversi merupakan substitusi dari pirimidin ke purin atau sebaliknya. Dalam studi ini, transversi didominasi

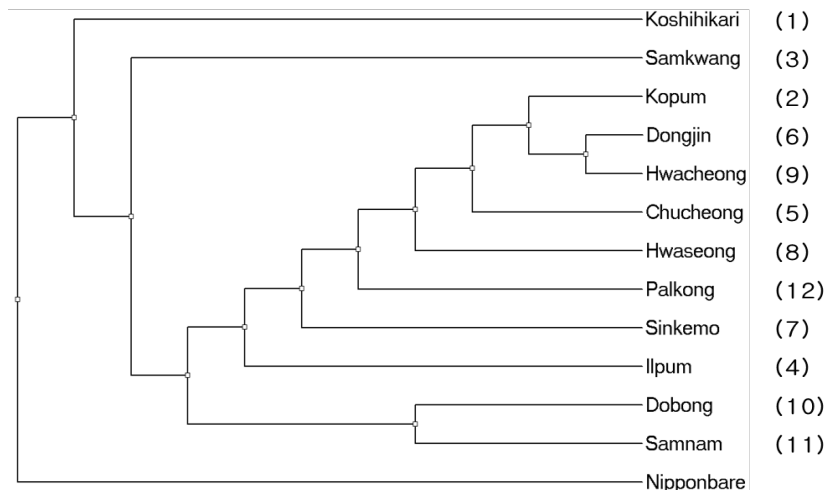
oleh T/G dan A/G, sementara transisi sebagian besar adalah T/C, C/T dan A/G dalam 12 varietas *japonica*. Rasio antara transisi dan transversi adalah 2.75 :1, mendukung keberadaan transisi yang biasanya lebih tinggi dari pada transversi tidak hanya pada gene namun juga pada level genom total pada tanaman (Van et al., 2013 ; Lestari et al., 2014).

**Tabel 1.** SNP dan indel pada sikuen parsial T6PP yang diobservasi dalam 12 varietas padi *japonica* berdasarkan primer TreA dan TreB

Primer	Varietas	Panjang sikuen konsensus (bp)	Jumlah SNP/indel	Daerah di genom				Tipe mutasi		
				Exon		Intron				
				Posisi (bp)	Jumlah	Posisi (bp)	Jumlah			
TreA	Nipponbare	987	1			rujukan				
	Koshihikari	987	1			675	3-4	Transversi	T/G	
	Kopum	987	Tidak ada							
	Samkwang	987	2	196	2			Inseri	-/G	
	Ilpum		987	3			282	2-3	Delesi	C/-
							386	2-3	Delesi	T/-
							668	3-4	Transisi	T/C
							754	3-4	Inseri	-/G
	Chucheong		987	2			664	3-4	Transisi	G/A
							768	3-4	Transisi	G/A
	Dongjin		987	Tidak ada						
	Sinkemo		987	Tidak ada						
	Hwaseong		987	5	119	2			Transisi	C/T
							243	2-3	Inseri	-/A
							375	2-3	Transversi	T/G
							386	2-3	Delesi	T/-
							489	3-4	Transisi	T/C
617							3-4	Transversi	T/G	
Hwacheong			1							
Dobong			Tidak ada							
Samnam			1	209	2			Transisi	C/T	
Palkong			Tidak ada							
TreB	Nipponbare	927				rujukan				
	Koshihikari	927	Tidak ada							
	Kopum	931	1			79-82	8-9	Inseri	-/ CTTT	
	Samkwang		927	Tidak ada						
							105	8-9	Transisi	A/G
	Ilpum		927	1			79-82	8-9	Inseri	-/ CTTT
	Chucheong									
	Dongjin		931	2			79-82	8-9	Inseri	-/ CTTT
							706	10-11	Transisi	A/G
	Sinkemo		927	1			892	10-11	Transisi	T/C
	Hwaseong		931	1			79-82	8-9	Inseri	-/ CTTT
	Hwacheong		931	3			79-82	8-9	Inseri	-/ CTTT
							58	8-9	Transisi	C/T
						545	9-10	Transisi	A/G	
Dobong		927	Tidak ada							
Samnam		927	Tidak ada							
Palkong		927	1	678	10			Transversi	T/A	

Berdasarkan jumlah mutasi, Hwaseong menunjukkan frekuensi paling tinggi, diikuti oleh Hwacheong dan Ilpum berdasarkan total amplifikasi oleh dua primer yang didisain. Berdasarkan primer TreA, varietas Kopum, Dongjin, Sinkemo dan Palkong menunjukkan kesamaan dengan kultivar rujukan, Nipponbare. Sedangkan amplifikasi dengan TreB, menunjukkan adanya kesamaan pada Koshihikari, Samkwang dan Samnam dengan Nipponbare. Dobong tidak teridentifikasi mutasi saat diamplifikasi T6PP dengan primer TreA dan TreB. Hal menarik ditemukan pada Chucheong, Dongjin, Hwaseong dan Hwacheong yang menunjukkan indel -/CTTT pada posisi yang sama pada sikuen konsensus. Pola polimorfisme ditemukan pada posisi yang sama pada beberapa varietas yang menunjukkan kedekatan genetik antara varietas tersebut.

Analisis filogeni dari variasi nukleotida (SNP dan idel) dari sikuen parsial T6PP dari 12 kultivar *japonica* yang dibandingkan dengan Nipponbare menghasilkan tiga klaster utama yaitu kultivar padi *japonica* rujukan (Nipponbare), varietas premium Jepang (Koshihikari), dan seluruh varietas *japonica* asal Korea Selatan. Klaster utama, masing-masing 11 asal Korea Selatan dan 2 varietas pada grup II dan III (hanya Nipponbare dan Koshihikari) secara berurutan. Pengelompokan varietas lebih cenderung berdasarkan genetik masing-masing varietas daripada ecotipe ataupun asal geografi. Koshihikari, varietas premium di Jepang yang toleran terhadap Aluminium dan dingin namun tidak tahan terhadap salinitas (Ma et al., 2002) cenderung lebih dekat dengan varietas *japonica* dari Korea Selatan dibandingkan dengan Nipponbare. Beberapa varietas mempunyai kedekatan dibanding lainnya, seperti pada Dongjin dan Hwacheong, Dobong dan Samnam (Gambar 1). Variasi SNP dan indel T6PP mengindikasikan adanya pengaruhnya terhadap diferensiasi padi *japonica*.



**Gambar 1.** Pohon filogeni dari 12 varietas padi *japonica* berdasarkan variasi nukleotida dari sikuen parsial *Trehalose 6 phosphate phosphatase*.

Analisis alignment dari sikuen parsial T6PP yang dihasilkan oleh primer TreB di 25868041-25868967bp pada gen T6PP, teridentifikasi indel (-/CTTT) pada beberapa varietas seperti Hwacheong dan Hwaseong (Gambar 2). Indel yang terdeteksi merupakan sumber marka molekuler yang dapat diaplikasikan di padi. Sebagai konsekuensi sebuah marka indel telah berhasil dikembangkan berdasarkan daerah *trehalose* (Lestari et al., 2015).

Sinkemo	TTCTTTCTTTCTTTCTTT----TTCTTAGTATGTTAGGCTAGAACTATATCTATTTAATT	116
Nipponbare	TTCTTTCTTTCTTTCTTT----TTCTTAGTATGTTAGGCTAGAACTATATCTATTTAATT	116
Ilpum	TTCTTTCTTTCTTTCTTT----TTCTTAGTATGTTAGGCTAGAACTATGCTATTTAATT	116
Samnam	TTTCTTTCTTTCTTTCTTT----TTCTTAGTATGTTAGGCTAGAACTATATCTATTTAATT	116
Koshihikari	TTCTTTCTTTCTTTCTTT----TTCTTAGTATGTTAGGCTAGAACTATATCTATTTAATT	116
Dobong	TTCTTTCTTTCTTTCTTT----TTCTTAGTATGTTAGGCTAGAACTATATCTATTTAATT	116
Palkong	TTTCTTTCTTTCTTTCTTT----TTCTTAGTATGTTAGGCTAGAACTATATCTATTTAATT	116
Chucheong	TTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTTCTTAGTATGTTAGGCTAGAACTATATCTATTTAATT	120
Hwaseong	TCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTTCTTAGTATGTTAGGCTAGAACTATATCTATTTAATT	120
Kopum	TTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTTCTTAGTATGTTAGGCTAGAACTATATCTATTTAATT	120
Dongjin	TTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTTCTTAGTATGTTAGGCTAGAACTATATCTATTTAATT	120
Hwacheong	TTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTTCTTAGTATGTTAGGCTAGAACTATATCTATTTAATT	120
	*****	

**Gambar 2.** Analisis *alignment* dari sikuen parsial T6PP yang dihasilkan oleh primer TreB. Indel yang terdeteksi menjadi sumber marka molekuler yang dapat diaplikasikan di padi .

Sehubungan dengan fungsi trehalose dan T6PP, berbagai penelitian menunjukkan bahwa T6PP dapat mendukung aktivitas Snf1 terkait protein kinase (SnRK1) (Zhang et al., 2009 ) yang merupakan integrator penting dalam jaringan peraturan tanaman seperti proses metabolisme, pertumbuhan tanaman dan respon stres (Gonzalez et al., 2007). Selain itu, ekspresi beberapa *Trehalosa-6-fosfat synthase* (TPS gen) juga dipengaruhi oleh status karbon misalnya pada Arabidopsis dan padi. Ekspresi tiga TPS gen Arabidopsis dan empat TPS gen padi meningkat secara signifikan dalam merespon kadar sukrosa rendah dalam sel (Glinski et al., 2005; Zang et al., 2011). Sensor gula diduga sangat penting sebagai alat pendeteksi dan dapat mengendalikan ledakan penyakit yang disebabkan oleh mikroba seperti cendawan (Fernandez dan Wilson, 2011).

Mengingat fungsi T6PP, maka selain dapat dimanfaatkan sebagai marka untuk evaluasi mutu rasa, marka molekuler yang dikembangkan tersebut perlu diuji untuk evaluasi koleksi plasma nutfah padi tidak hanya *japonica* namun juga sub-spesies lain seperti *indica* dan *japonica* terkait ketahanannya terhadap cekaman abiotik dan biotik. Marka molekuler ini mungkin tidak memiliki fungsi langsung tetapi marka tersebut masih dapat berhubungan dengan variasi dalam sifat-sifat fenotipik melalui linkage disequilibrium antara situs marka dan domain fungsional dari gen target (Bao et al. 2006a, 2006b).

## KESIMPULAN

Variasi nukleotida khususnya SNP dan indel pada sikuen parsial T6PP memberikan informasi penting adanya mutasi pada daerah koding dan non-koding maupun tipe mutasinya pada gen tersebut. Informasi awal kekerabatan genetik antara varietas membantu dalam seleksi tetua dalam program pemuliaan padi japonica. Hasil penelitian ini merupakan informasi penting untuk pengembangan marka molekuler berdasarkan gen T6PP dalam pemuliaan padi japonica. Diperlukan penelitian terkait fisiologi untuk membuktikan pengaruh T6PP pada padi.

## DAFTAR PUSTAKA

- Avonce N, Leyman B, Mascorro-Gallardo JO, Van Dijk P, Thevelein JM, Iturriaga G. 2004. The *Arabidopsis* trehalose-6-P synthase AtTPS1 gene is a regulator of glucose, abscisic acid, and stress signaling. *Plant Physiol.* 136(3):3649–3659.
- Avonce N, Mendoza-Vargas A, Morett E, Iturriaga G. 2006. Insights on the evolution of trehalose biosynthesis. *BMC Evol. Biol.* 6:109.
- Baena-Gonzalez E, Rolland F, Thevelein JM, Sheen J. 2007. A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. *Nature* 448(7156):938–942
- Bao JS, Corke H, Sun M. 2006a. Microsatellites, single nucleotide polymorphisms and a sequence tagged site in starch-synthesizing genes in relation to starch physicochemical properties in nonwaxy rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 113: 1185–1196.
- Bao JS, Corke H, Sun M. 2006b. Nucleotide diversity in starch synthase IIa and validation of single nucleotide polymorphisms in relation to starch gelatinization temperature and other physicochemical properties in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 113, 1171–1183.
- Barreiro LB, Laval G, Quach H, Patin E, Quintana-Murci L. 2008. “Natural selection has driven population differentiation in modern humans”. *Nature Genetics* 40 (3): 340–345.
- Ching A, Caldwell KS, Jung M, Dolan M, Smith OS, Tingey S, Morgante M, Rafalski A. 2002. SNP frequency, haplotype structure and linkage disequilibrium in elite maize inbred lines. *BMC Genet.* 3:1–14. 745.
- Eastmond PJ, van Dijken AJ, Spielman M, Kerr A, Tissier AF, Dickinson HG, Jones JD, Smeekens SC, Graham IA. 2002. Trehalose-6-phosphate synthase I, which catalyses the first step in trehalose synthesis, is essential for *Arabidopsis* embryo maturation. *Plant J.* 29(2):225–235.
- Elbein AD, Pan YT, Pastuszak I, Carroll D. 2003. New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology* 13(4):17R–27R.

- Fernandez J, Wilson R A. 2011. The Sugar Sensor, Trehalose-6-Phosphate Synthase (Tps1), Regulates Primary and Secondary Metabolism during Infection by the Rice Blast Fungus: Will Magnaporthe oryzae's "Sweet Tooth" become Its "Achilles' Heel"? *Mycology* 2(1): 47-53.
- Garland S, Lewin L, Blakeney A, Reinke R, Henry R. 2000. PCR-based molecular markers for the fragrance gene in rice (*Oryza sativa* L). *Theor. Appl. Genet.* 98: 502–508.
- Glinzki M, Weckwerth W. 2005. Differential multisite phosphorylation of the trehalose-6-phosphate synthase gene family in *Arabidopsis thaliana*: a mass spectrometry-based process for multiparallel peptide library phosphorylation analysis. *Mol. Cell Proteomics* 4(10):1614–1625.
- Gomez LD, Baud S, Gilday A, Li Y, Graham IA. 2006. Delayed embryo development in the *Arabidopsis* trehalose-6-phosphate synthase 1 mutant is associated with altered cell wall structure, decreased cell division and starch accumulation. *Plant J.* 46(1):69–84.
- Hart Hill JE, Meek SEM, Morrice N, Peggiew M W, Borch J, Wong BHC, MacKintosh C. 2006. Phosphorylation and 14-3-3 binding of *Arabidopsis* trehalose-phosphate synthase 5 in response to 2-deoxyglucose. *Plant J.* 47:211–223.
- Jain NK, Roy L. 2010. Trehalose and protein stability. *Curr. Protoc. Protein Sci.* Chapter 4, Unit 4.9.
- Khaing AA, Li G, Wang XQ, Yoon MY, Kwon AW, Lee CY, Park BS, Park YJ. 2014. Rice genoplasm in Korea and association mapping. 2014. *Intech*. Pg. 79-103. <http://dx.doi.org/10.5772/56614>.
- Kwon SJ, Cho YC, Kwon SW, Oh CS, Suh JP, Shin YS, Kim YG, Holligan D, Wessler SR, Hwang HG, et al. 2008a. QTL mapping of agronomic traits using an RIL population derived from a cross between temperate japonica cultivars in rice (*Oryza sativa* L.). *Breed. Sci.* 58:271–279.
- Kwon SW, Cho YC, Kim YG, Suh JP, Jeung JU, Roh JH, Lee SK, Jeon JS, Yang SJ, Lee YT. 2008b. Development of near-isogenic japonica rice lines with enhanced resistance to *Magnaporthe oryzae*. *Mol. Cells* 25:407–416.
- Lestari P, Kang YJ, Han KS, Gwag JG, Moon JK, Kim YH, Lee YH, Lee SH. 2014. Genome-wide single nucleotide polymorphism and validation in adzuki bean. *Mol. Breed.* 33: 497–501.
- Lunn JE. 2007. Gene families and evolution of trehalose metabolism in plants. *Funct Plant Biol* 34(6):550–563. doi:10.1071/FP06315
- Lunn JE, Feil R, Hendriks JH, Gibon Y, Morcuende R, Osuna D, Scheible WR, Carillo P, Hajirezaei MR, Stitt M. 2006. Sugar induced increases in trehalose 6-phosphate are correlated with redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase and higher rates of starch synthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem J.* 397(1):139–148.

- Ma JF, Shen R, Zhao Z, Wissuwa M, Takeuchi Y, Ebitani T, Yano M. 2002. Response of rice to Al stress and identification of QTL for Al tolerance. *Plant Cell Physiol.* 43(6): 652–659.
- Murray MG, Thompson WF. 1980. Rapid isolation of high molecular weight DNA. *Nucleic Acids Res.* 8: 4321–4325.
- NASTI (National Agricultural Science and Technology Institute). 1996. Republic of Korea: Country report to the FAO international technical conference on plant genetic resource. pp.59
- Ponnu J, Wahl V, Markus S. 2011. Trehalose-6-phosphate : connecting plant metabolism and development. *Frontiers in Plant Science.* 2: 1–6.
- Rozen S, Skaletsky HJ. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol.* 132:365–386.
- Sambrook J, Russell DW. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Satoh-Nagasawa N, Nagasawa N, Malcomber S, Sakai H, Jackson D. 2006. A trehalose metabolic enzyme controls inflorescence architecture in maize. *Nature* 441(7090):227–230.
- Shima S, Matsui H, Tahara S, Imai R. 2007. Biochemical characterization of rice trehalose-6-phosphate phosphatase supports distinctive function of soft hese plant enzymes. *FEBS J.* 274: 1192–1201.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol Evol.* 24:1596–1599.
- van Dijken AJ, Schluepmann H, Smeekens SC. 2004. Arabidopsis trehalose-6-phosphate synthase 1 is essential for normal vegetative growth and transition to flowering. *Plant Physiol* 135(2):969–977.
- Van K, Kang YJ, Han KS, Lee YH, Gwag JG, Moon JK, Lee SH. 2013. Genome-wide SNP discovery in mungbean by Illumina HiSeq. *Theor. Appl. Genet.* 126(8):2017–2027.
- Zang B, Li H, Li W, Deng XW, Wang X. 2011. Analysis of trehalose-6-phosphate synthase (TPS) gene family suggests the formation of TPS complexes in rice. *Plant Mol. Biol.* DOI 10.1007/s11103-011-9781-1
- Zhang Y, Primavesi LF, Jhureea D, Andralojc PJ, Mitchell RAC, Powers SJ, Schluepmann H, Delatte T, Wingler A, Paul MJ. 2009. Inhibition of Snf1-related protein kinase (SnRK1) activity and regulation of metabolic pathways by trehalose 6-phosphate. *Plant Physiol.* doi:10.1104/pp.108.133934