DOI 10.14456/tjg.2014.4 Thai J. Genet. 2014, 7(2) : 97–103

ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างข้าวไทยที่ไวต่อช่วงแสงและไม่ไวต่อช่วงแสง

Genetic differences between photoperiod-sensitive and non-photoperiod-sensitive Thai rice varieties

ยุพเยาว์ คบพิมาย[1]* ศรัณย์ จีนะเจริญ[2] ศรีกาญจนา คล้ายเรือง[3] วราภรณ์ แสงทอง[1]

Yuppayao Kophimai[1]*, Saran Cheenacharoen[2], Srikanjana Klayraung[3], Varaporn Sangtong[1]

[1]สาขาวิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290

[2]สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50300

[3]สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290

[1]Department of Genetics, Faculty of Science, Maejo University, Chiang Mai 50290, Thailand

[2]Program in Biology, Faculty of Science and Technology, Chiang Mai Rajabhat University, Chiang Mai 50300, Thailand

[3]Department of Biotechnology, Faculty of Science, Maejo University, Chiang Mai 50290, Thailand

**Corresponding author: kophimai@yahoo.com*

บทคัดย่อ

ยีน *Hd1* เป็นยีนหลักที่ควบคุมการตอบสนองต่อช่วงแสงของข้าว การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาลำดับเบสของยีน *Hd1* ในข้าวไทยที่ไวต่อช่วงแสง ได้แก่ ขาวตาแห้ง 17, เหนียวสันป่าตอง, กข 6, และ กข 15 และข้าวที่ไม่ไวต่อช่วงแสง ได้แก่ พิษณุโลก 2, แพร่ 1, กข 21 และ สุรินทร์ 1 เพื่อให้เข้าใจกลไกการตอบสนองต่อช่วงแสงของข้าวไทยมากขึ้น จากการศึกษาลำดับเบสบริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *Hd1* ในข้าวทั้ง 8 พันธุ์ พบการแทนที่เบส 2 ตำแหน่ง และความผันแปรของจำนวนซ้ำของเบสไซโทซีน 1 ตำแหน่ง (20-25 คู่เบส) แต่ความผันแปรของเบสบริเวณโพรโมเตอร์น่าจะไม่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อช่วงแสงของข้าวที่ศึกษา เนื่องจากบริเวณที่มีความผันแปรไม่ใช่ตำแหน่งจับของทรานสคริปชัน แฟคเตอร์ หรือไม่มีความแตกต่างระหว่างข้าวที่ไวต่อช่วงแสงและไม่ไวต่อช่วงแสง ลำดับเบสบริเวณเอกซอน 1 พบการแทนที่เบส 1 ตำแหน่ง แต่ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงชนิดของกรดอะมิโน ลำดับเบสบริเวณเอกซอน 2 พบการขาดหายไปของ ดีเอ็นเอความยาว 4 คู่เบส ในข้าวที่ไม่ไวต่อช่วงแสงซึ่งทำให้เกิดการเลื่อนของรหัสพันธุกรรมและทำให้กรดอะมิโนในบริเวณ nuclear localization signal (CCT motif) ในข้าวที่ไม่ไวต่อช่วงแสงเปลี่ยนไป ซึ่งอาจทำให้ยีน *Hd1* สูญเสียการทำงานและทำให้ข้าวไม่ตอบสนองต่อช่วงแสง

ABSTRACT

Hd1 is a major gene controlling response to photoperiod in rice. This study aimed to investigate DNA sequences of *Hd1* gene in Thai rice including photoperiod-sensitive varieties (Khaotahhaeng 17, Neawsunpatong, RD 6 and RD 15) and non-photoperiod-sensitive varieties (Phitsanulok 2, Phrae 1, RD 21 and Surin 1) to deepen understanding in photoperiod response mechanism in Thai rice. Among eight rice varieties, two base substitutions and length polymorphism of poly C (20-25 bp) were found in the promoter region. However, these variations may be not responsible for photoperiod sensitivity in Thai rice because the variable positions were not the transcription factor binding sites or were not different between photoperiod-sensitive and non-photoperiod-sensitive varieties. One base pair substitution was detected in the first exon but did not alter amino acid residue. In the second exon, deletion of four base pairs was found only in non-photoperiod-sensitive varieties. The deletion caused a frameshift in DNA sequences and changes in amino acid residues in the nuclear localization signal (CCT motif) and may therefore

result in a loss of function of *Hd1* gene in the non-photoperiod-sensitive varieties.

คำสำคัญ: ข้าว; ยีน *Hd1*; การไวต่อช่วงแสง

Keywords: rice; *Hd1* gene; photoperiod sensitivity

บทนำ

การตอบสนองต่อช่วงแสงของข้าวควบคุมด้วยยีนหลายยีน ตัวอย่างเช่น *OsGI*, *OsMADS51*, *Hd1*, *Ehd1* และ *Hd3a* แต่ยีน *Hd1* เป็นยีนหลักในการควบคุมการตอบสนองต่อช่วงแสงของข้าว โดยทำหน้าที่กระตุ้นหรือยับยั้งการแสดงออกของยีน Hd3a ซึ่งเป็นยีนที่กระตุ้นการสร้างดอกของข้าว (floral activator; Takahashi *et al*., 2009) จากการศึกษาของ Yano et al. (2000) พบว่ายีน *Hd1* ทำหน้าที่กระตุ้นการออกดอกของข้าวในสภาพวันสั้น แต่ยับยั้งการออกดอกของข้าวในสภาพวันยาว ยีน *Hd1* ประกอบด้วย 2 เอกซอน และ 1 อินทรอน ลำดับดีเอ็นเอของยีน *Hd1* คล้ายกับยีน *CONSTANS* (*CO*) ใน Arabidopsis ซึ่งเป็นรหัสพันธุกรรมของ zinc finger domain (บริเวณปลาย N) และ nuclear localization signal (CCT; บริเวณปลาย C) แอลลีลของยีน *Hd1* ในข้าวพันธุ์ Nipponbare เป็นแอลลีลที่ทำหน้าที่ได้ตามปกติ (functional allele) ทำให้ข้าวซึ่งเป็นพืชวันสั้นพันธุ์ Nipponbare ตอบสนองต่อช่วงแสง

การเปลี่ยนแปลงลำดับเบสของยีน *Hd1* เช่น การขาดหายไปของลำดับเบส การเคลื่อนของรหัสพันธุกรรม (Ebana *et al*., 2011) รวมถึงการแทรกของรหัสพันธุกรรม (Yano *et al*., 2000) ทำให้ยีน *Hd1* สูญเสียการทำหน้าที่ (loss of function) การเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนที่ทำให้ยีน *Hd1* ไม่สามารถทำหน้าที่ได้อย่างสมบูรณ์ ส่วนใหญ่เกิดขึ้นกับกรดอะมิโนในส่วนเอกซอนที่ 2 ที่เป็น nuclear localization signal (CCT domain; Takahashi *et al*., 2009) Roongsattham *et al*. (2006) จากการศึกษาลำดับเบสของยีน *Hd1* ระหว่างข้าวไทยที่ตอบสนองต่อช่วงแสง (ขาวดอกมะลิ 105) และไม่ตอบสนองต่อช่วงแสง (สุพรรณบุรี 1) นั้น ไม่พบความแตกต่างของลำดับเบสดังกล่าว ในการทดลองครั้งนี้จึงต้องการศึกษาลำดับเบสของยีน *Hd1* ในข้าวไทยพันธุ์อื่นๆ รวมถึงลำดับเบสบริเวณโพรโมเตอร์ของข้าวที่ทำการศึกษาด้วย เพื่อให้เข้าใจกลไกการตอบสนองต่อช่วงแสงของข้าวไทยมากยิ่งขึ้น

อุปกรณ์และวิธีการ

การศึกษาอายุวันออกดอกของข้าว

ข้าวที่ศึกษามีทั้งหมด 8 พันธุ์ คือ กข 5, กข 6, กข 21, ขาวตาแห้ง 17, เหนียวสันป่าตอง, แพร่ 1, พิษณุโลก 2 และ สุรินทร์ 1 ทำการปลูกข้าวทั้ง 8 พันธุ์ ใน 3 ฤดู ที่มีความยาวช่วงแสงต่างกันเพื่อศึกษาผลของความยาวช่วงแสงต่ออายุวันออกดอกของข้าว คือ ฤดูที่ 1 เริ่มปลูกวันที่ 1 กรกฎาคม 2550 (ฤดูนาปี) ฤดูที่ 2 เริ่มปลูกวันที่ 20 ตุลาคม 2550 (ช่วงวันสั้น) ฤดูปลูกที่ 3 เริ่มปลูกวันที่ 1 เมษายน 2551 (ช่วงวันยาว) ในเรือนกระจกมหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่

ก่อนปลูกข้าวทำการหยุดระยะพักตัวของข้าวโดยอบเมล็ดข้าวในตู้บ่มอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 6 วัน แล้วจึงแช่เมล็ดข้าวทิ้งไว้ข้ามคืน จากนั้นจึงโรยเมล็ดข้าวลงในกระถางพลาสติกที่บรรจุดินและมีน้ำอยู่ พันธุ์ละ 3 กระถาง ดินที่ใช้ปลูกข้าวแต่ละพันธุ์เตรียมโดยวิธีเดียวกันและนำมาจากกองผสมเดียวกัน เมื่อข้าวอายุประมาณ 3 สัปดาห์ จึงถอนแยกให้เหลือข้าวกระถางละ 1 ต้น บันทึกอายุวันออกดอกของข้าวเมื่อข้าวออกดอกวันแรก วิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างอายุวันออกดอกของข้าวที่ปลูกแต่ละฤดู โดยใช้โปรแกรม R version 3.0.2 (R Development Core Team, 2013) ตามวิธี Duncan's new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ยกเว้นข้าวพันธุ์พิษณุโลก 2, กข 21 และ สุรินทร์ 1 ใช้การวิเคราะห์ตามวิธีของ Wilcoxon rank sum test เนื่องจากการแจกแจงอายุวันออกดอกของข้าวไม่เป็นแบบปกติตามวิธี Shapiro-Wilk normality test และความแปรปรวนของตัวอย่างไม่เท่ากันตามวิธี Bartlett test

การวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณโพรโมเตอร์ และเอกซอนของยีน *Hd1*

สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากใบข้าวที่ปลูกในฤดูที่ 1 โดยใช้ชุดสกัด GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit (SIGMA, USA) ออกแบบไพรเมอร์จากลำดับเบสของข้าวพันธุ์ Nipponbare ให้จำเพาะกับดีเอ็นเอบริเวณหน้ายีน เอกซอน 1 และเอกซอน 2 รายละเอียดของไพรเมอร์ที่ใช้แสดงใน Table 1

Table 1 Details of primers used to amplify *Hd1* gene.

Specific location	Primer sequence (5'-3')
Promoter	FP: GAGAATCAGTGTACTCATCAC
	RP: GCTTGCACCACATGGACAAGTC
	FP1: CATTGGTAATAATTTGACTTCTCC
	RP1: TAACCTGAACTGATGTCAATACC
	FP2: GCATGGCATAGTGTTAAAGGAG
	RP2:GGTAGCCAGTGCAGATACATG
	FP3: CGTTGTACCATACTCTGCACC
	RP3: GAATTGAGTTTGTTATGCTGTGG
Exon 1	F1: AGAGGAACAGGAGAAGACGC
	R1: GCACCTGCACGTCGCACG
	F2: TACCTGTGCGCGTCGTGC
	R2: GTTCATGCATCCCATACTGC
	F3: GCAGCAACAACGGCATGTATT
	R3: ATGTAGTAACAACTAACTAACAAC
Exon 2	F4: GGTCTCTGACACCTGCAATC
	R4: GTCTAGAACTACTCCCACTGG

หลังจากนั้น เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยมีปริมาตรสุดท้าย 15 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ไพรเมอร์ อย่างละ 0.4 ไมโครโมลาร์ GoTaq® Green Master Mix (Promega, USA) 7.5 ไมโครลิตร และดีเอ็นเอ ประมาณ 13 นาโนกรัม ทำพีซีอาร์ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที ตามด้วย 30 รอบ ของ 95 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที 57 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จากนั้นจึงทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ตรวจสอบความสำเร็จในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส แล้วจึงส่งผลผลิตพีซีอาร์ไปตรวจสอบลำดับเบส วิเคราะห์ลำดับเบสโดยใช้โปรแกรม BioEdit 5.0.9 (Hall, 1999) ลำดับเบสของยีน *Hd1* ของข้าวทั้ง 8 พันธุ์ ได้เก็บไว้ในฐานข้อมูล GenBank (KJ741861 - KJ741868) แปลงลำดับเบสเป็นโปรตีนโดยใช้โปรแกรม Translate (Artimo *et al*., 2012) เปรียบเทียบลำดับเบสและโปรตีนของข้าวแต่ละพันธุ์ด้วยโปรแกรม Clustal Omega (McWilliam *et al*., 2013) หาบริเวณอนุรักษ์ในลำดับกรดอะมิโนในบริเวณเอกซอน 1 และเอกซอน 2 โดยใช้โปรแกรม CD Search (Marchler-Bauer *et al*., 2011)

ผลการทดลอง

ผลของความยาวช่วงแสงต่ออายุวันออกดอกของข้าว

จากการปลูกข้าว 8 พันธุ์ เพื่อศึกษาผลของความยาวช่วงแสงต่ออายุวันออกดอกของข้าว พบว่าความยาวช่วงแสงมีผลต่ออายุวันออกดอกของข้าว พันธุ์ขาวตาแห้ง 17, เหนียวสันป่าตอง, กข 6 และ กข 15 โดยอายุวันออกดอกของข้าวแปรผันตามความยาวช่วงแสง แต่อายุวันออกดอกของข้าวพันธุ์พิษณุโลก 2, แพร่ 1, กข 21 และ สุรินทร์ 1 มีความผันแปรน้อยมากเมื่อปลูกในช่วงความยาวแสงต่างกันและไม่แปรผันตามความยาวของช่วงแสง (Figure 1)

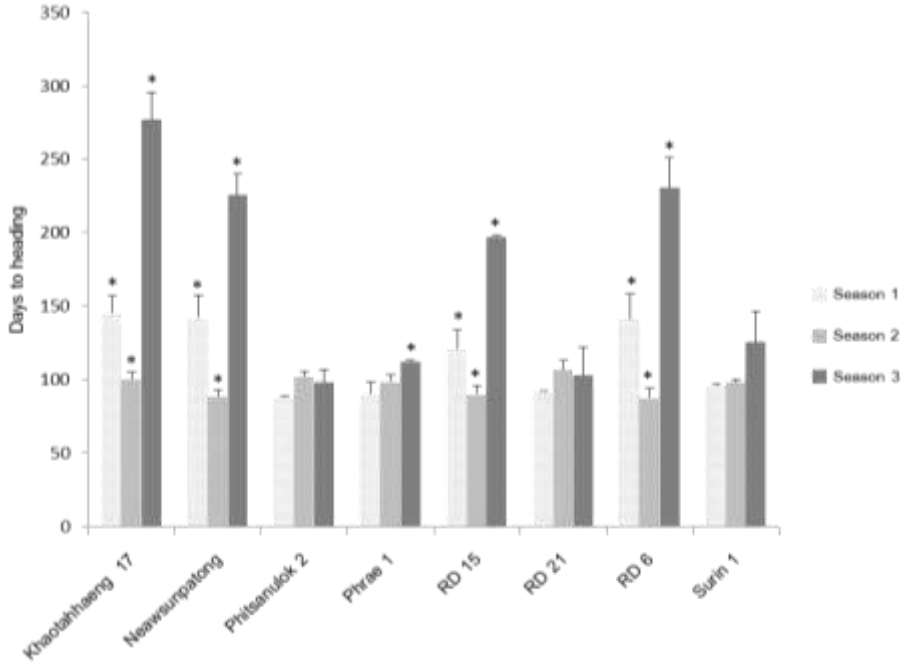

Figure 1 Effects of day length on days to heading of Thai rice varieties. Season 1 started from July 1, 2007 (in season). Season 2 started from October 20, 2007 (short-day condition). Season 3 started from April 1, 2008 (long-day condition). Vertical bars indicate standard deviations (n = 3). Stars indicate significant differences from other seasons at $P < 0.05$.

ความผันแปรของลำดับเบส

จากการตรวจสอบลำดับเบสของข้าวทั้ง 8 พันธุ์ พบการแทนที่เบสในกลุ่มไพริมีดีนและพิวรีนอย่างละ 1 ตำแหน่งและความผันแปรในจำนวนซ้ำของเบสไซโทซีนระหว่าง 20-25 คู่เบส ในบริเวณ โพรโมเตอร์ ลำดับดีเอ็นเอบริเวณเอกซอน 1 ของข้าวทั้ง 8 พันธุ์มีความคล้ายคลึงกันมาก พบการแทนที่เบสในกลุ่มไพริมีดีนเพียง 1 ตำแหน่งเท่านั้น ส่วนบริเวณเอกซอน 2 พบการขาดหายไปของดีเอ็นเอความยาว 4 คู่เบส ในข้าวที่ไม่ไวต่อช่วงแสงซึ่งได้แก่ ข้าวพันธุ์พิษณุโลก 2, แพร่ 1, กข 21 และ สุรินทร์ 1 (Table 2)

Table 2 Variable position in the promoter and exon regions of *Hd1* gene.

Rice variety	Variable position*				
	Promoter			Exon 1	Exon 2
	398	611	653 (Poly C)	528	322
Khaotahhaeng 17	T	A	25	T	AGAA
Neawsunpatong	T	G	24	C	AGAA
Phitsanulok 2	T	A	20	T	4 bp deletion
Phrae 1	T	A	21	T	4 bp deletion
RD 15	C	A	24	C	AGAA
RD 21	T	A	21	T	4 bp deletion
RD 6	T	A	24	C	AGAA
Surin 1	T	A	21	T	4 bp deletion

* Position according to DNA alignment of each part of *Hd1* gene.

ความแตกต่างของลำดับกรดอะมิโน

ลำดับกรดอะมิโนบริเวณเอกซอน 1 ของข้าวทั้ง 8 พันธุ์ ไม่มีความแตกต่างกัน และพบบริเวณอนุรักษ์ B-Box type zinc finger domain ที่ตำแหน่ง 33–77 (Figure 2) ลำดับกรดอะมิโนบริเวณเอกซอน 2 มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มข้าวที่ไวต่อช่วงแสง และกลุ่มข้าวที่ไม่ไวต่อช่วงแสง เนื่องจากมีการขาดหายไปของดีเอ็นเอความยาว 4 คู่เบส ในข้าวที่ไม่ไวต่อช่วงแสง ทำให้เกิดการเลื่อนของรหัสพันธุกรรม และเมื่อวิเคราะห์หน้าที่ของโปรตีนพบบริเวณอนุรักษ์ CCT motif ในข้าวทั้ง 8 พันธุ์ แต่ข้าวที่ไม่ไวต่อช่วงแสง มี CCT motif ที่ไม่สมบูรณ์ (Figure 2)

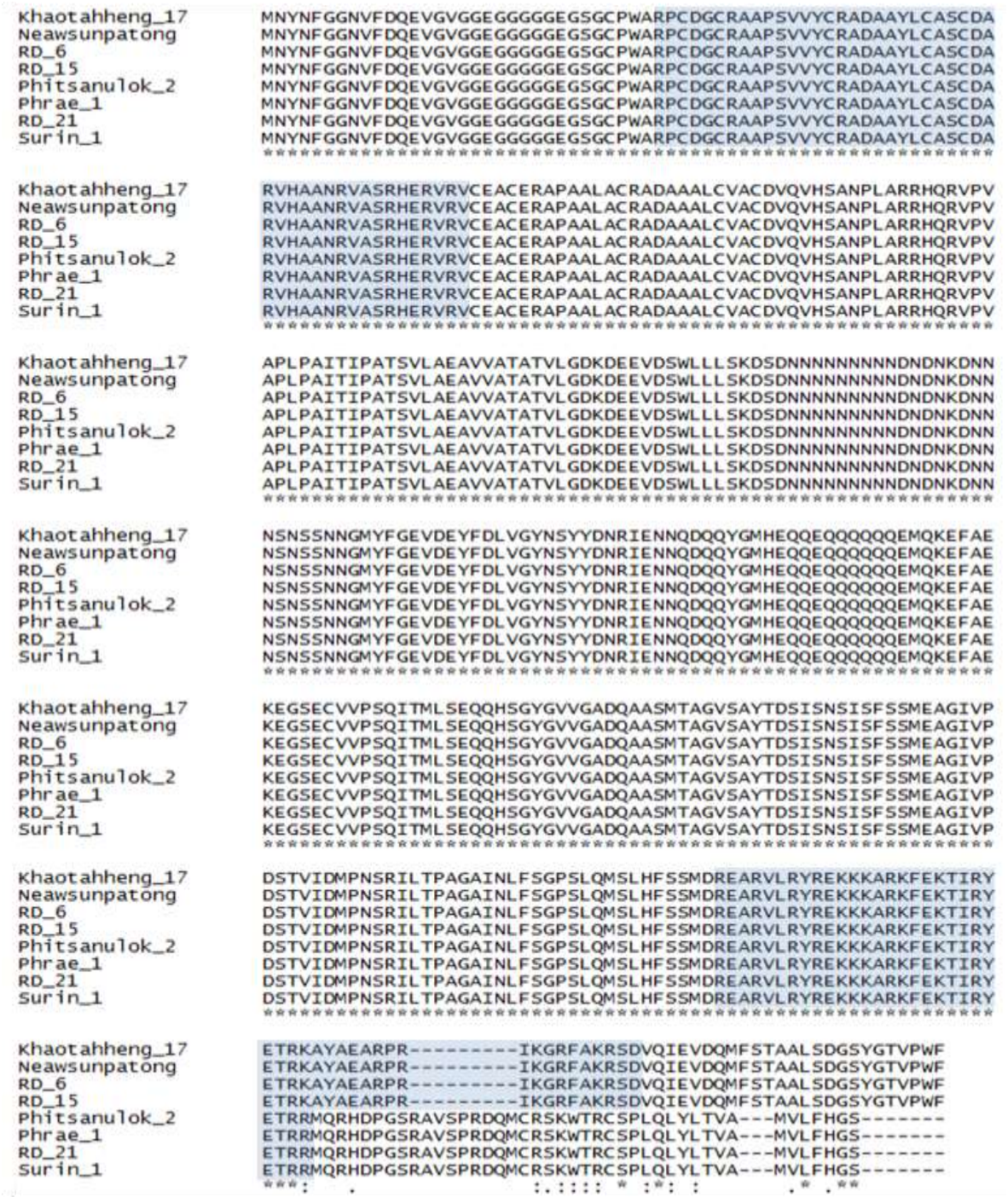

Figure 2 Amino acid alignment of *Hd1* gene. The first gray box indicates B-Box type zinc finger domain. The second gray box indicates CCT motif which is incomplete in non-photoperiod-sensitive rice varieties (Phitsanulok 2, Phrae 1, RD 21 and Surin 1).

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาอายุวันออกดอกของข้าวที่ปลูกในช่วงความยาวแสงต่างกัน พบว่าอายุวันออกดอกของข้าวพันธุ์ขาวตาแห้ง 17, เหนียวสันป่าตอง, กข 6 และ กข 15 แปรผันตามความยาวของช่วงแสง เนื่องจากข้าวเหล่านี้เป็นข้าวที่ไวต่อช่วงแสง (กรมวิชาการเกษตร, 2546) แต่ความยาวของช่วงแสงไม่มีผลต่ออายุวันออกดอกของข้าวพันธุ์พิษณุโลก 2, แพร่ 1, กข 21 และ สุรินทร์ 1 เนื่องจากข้าวเหล่านี้ไม่ไวต่อช่วงแสง (กรมวิชาการเกษตร, 2546)

จากการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณโพรโมเตอร์พบความผันแปร 3 ตำแหน่ง คือ การแทนที่เบสในกลุ่มไพริมิดีน การแทนที่เบสในกลุ่มพิวรีน และความผันแปรในจำนวนเบสไซโทซีน แต่เมื่อตรวจสอบ Transcription factor binding sites ในบริเวณโปรโมเตอร์โดยใช้โปรแกรม TSSP (Plant Pol II Promoter region and start of transcription) จากเวปไซต์ http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=tssp&group=programs&subgroup=promoter (Solovyev and Salamov, 1997; Solovyev, 2001; Solovyev and Shahmuradov, 2003) และ โปรแกรม PLACE (A Database of Plant Cis-acting Regulatory DNA Element) จากเวปไซต์ http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html (Prestridge, 1991; Higo *et al*., 1999) พบว่าในบริเวณที่พบความผันแปร 3 ตำแหน่งนี้ มีเพียงบริเวณที่มีการแทนที่เบสในกลุ่มไพริมิดีนเท่านั้นที่น่าจะเป็น Transcription factor binding sites แต่เมื่อตรวจสอบลำดับเบสในตำแหน่งนี้พบว่าข้าวทุกพันธุ์มีลำดับเบสเป็น T ยกเว้นข้าว กข 15 ที่มีลำดับเบสเป็น C ดังนั้นความผันแปรของลำดับดีเอ็นเอในบริเวณโพรโมเตอร์จึงไม่น่าจะมีผลต่อการตอบสนองต่อช่วงแสงของข้าว

เมื่อพิจารณาการแทนที่ของลำดับเบสในกลุ่มไพริมิดีนในบริเวณเอกซอน 1 พบว่าไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสในบริเวณเอกซอน 1 จึงไม่มีผลต่อการตอบสนองต่อช่วงแสงของข้าวที่ทำการศึกษา

จากการเปรียบเทียบลำดับเบสบริเวณเอกซอน 1 และเอกซอน 2 ของข้าวทั้ง 8 พันธุ์ กับข้าวพันธุ์ Nipponbare ซึ่งเป็นข้าวที่ไวต่อช่วงแสงและมียีน *Hd1* ที่เป็นแอลลีลที่ทำหน้าที่ได้ตามปกติ พบการขาดหายไปของดีเอ็นเอความยาว 4 คู่เบส ในข้าวที่ไม่ไวต่อช่วงแสง (พิษณุโลก 2, แพร่ 1, กข 21 และ สุรินทร์ 1) ซึ่งการขาดหายไปของดีเอ็นเอนี้ทำให้เกิดการเลื่อนของรหัสพันธุกรรมและทำให้ลำดับกรดอะมิโนเปลี่ยนไป (Figure 2) เป็นผลให้บริเวณอนุรักษ์ CCT motif ไม่สมบูรณ์ เนื่องจากบริเวณอนุรักษ์ CCT motif ทำหน้าที่เป็น nuclear localization signals (Yano *et al*., 2000) ดังนั้นแอลลีลของยีน *Hd 1* ในข้าวที่ไม่ไวต่อช่วงแสงจึงเป็นแบบที่ไม่สามารถทำหน้าที่ได้อย่างสมบูรณ์ (nonfunctional allele) ซึ่งทำให้ข้าวไม่ตอบสนองต่อช่วงแสง ส่งผลให้การออกดอกของข้าวไม่ขึ้นอยู่กับระยะเวลาการได้รับแสง

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับเงินทุนสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ 2550 ผู้เขียนขอขอบคุณ คุณศรีสกุล ทำดี ศูนย์เมล็ดพันธุ์ข้าวเชียงใหม่ และกรมการข้าว กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ที่อนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์ข้าว ผศ.ดร.แสงทอง พงษ์เจริญกิต และ ผศ.ดร.ช่อทิพา สกูลสิงหาโรจน์ ที่ให้คำแนะนำและเอื้อเฟื้อสารเคมีบางส่วนในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร (2546) ข้าวและธัญพืชเมืองหนาว พันธุ์ดี 30 ปี กรมวิชาการเกษตร พิมพ์ที่ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย กรุงเทพฯ

Artimo P, Jonnalagedda M, Arnold K, Baratin D, Csardi G, de Castro E, Duvaud S, Flegel V, Fortier A, Gasteiger E *et al*. (2012) ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. Nucleic Acids Res 40: W597–W603.

Ebana K, Shibaya T, Wu JZ, Matsubara K, Kanamori H, Yamane H, Yamanouchi U, Mizubayashi T, Kono I, Shomura A *et al*. (2011) Uncovering of major genetic factors generating naturally occurring variation in heading date among Asian rice cultivars. Theor Appl Genet 122: 1199–1210.

Hall TA (1999) BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symp Ser 41: 95–98.

Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M and Korenaga T (1999) Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database. Nucleic Acids Res 27: 297–300.

Marchler-Bauer A, Lu SN, Anderson JB, Chitsaz F, Derbyshire MK, DeWeese-Scott C, Fong JH, Geer LY, Geer RC, Gonzales NR *et al*. (2011) CDD: a conserved domain database for the functional annotation of proteins. Nucleic Acids Res 39: D225–D229.

McWilliam H, Li W, Uludag M, Squizzato S, Park YM, Buso N, Cowley AP, Lopez R (2013) Analysis tool web services from the EMBL-EBI. Nucleic Acids Res 41: W597–W600.

Prestridge DS (1991) SIGNAL SCAN: A computer program that scans DNA sequences for eukaryotic transcriptional elements. CABIOS 7: 203–206.

R Development Coe Team (2013) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0.

Roongsattham P, Pongtongkam P, Thongpan A, Kaveeta L, Harinasut P, Peyachoknagul S (2006) *Hd1*, *Hd3a*, and *Hd6* Genes: Possible DNA methylation roles in photoperiod sensitive gene regulation of rice KDML 105 (*Oryza sativa* L.). Kasetsart J (Nat Sci) 40: 462–471.

Solovyev VV, Salamov AA (1997) The Gene-Finder computer tools for analysis of human and model organisms genome sequences. In: Rawling C, Clark D, Altman R, Hunter L, Lengauer T, Wodak S (eds) Proceedings of the Fifth International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology. AAAI Press, Halkidiki, Greece, pp 294–302.

Solovyev VV (2001) Statistical approaches in Eukaryotic gene prediction. In: Balding D, Bishop M, Cannings C (eds) Handbook of Statistical Genetics. John Wiley & Sons, Ltd., pp 83–127.

Solovyev VV, Shahmuradov IA (2003) PromH: Promoters identification using orthologous genomic sequences. Nucleic Acids Res 31: 3540–3545.

Takahashi Y, Teshima KM, Yokoi S, Innan H, Shimamoto K (2009) Variations in Hd1 proteins, Hd3a promoters, and Ehd1 expression levels contribute to diversity of flowering time in cultivated rice. Proc Natl Acad Sci USA 106: 4555–4560.

Yano M, Katayose Y, Ashikari M, Yamanouchi U, Monna L, Fuse T, Baba T, Yamamoto K, Umehara Y, Nagamura Y *et al.* (2000) *Hd1*, a major photoperiod sensitivity quantitative trait locus in rice, is closely related to the *Arabidopsis* flowering time gene *CONSTANS*. Plant Cell 12: 2473–2484.

http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/ (April 2014).

http://www.R-project.org.