

College of Bioresources and Agriculture National Taiwan University Master Thesis

植物耐温度逆境主要轉錄因子及所調節基因之

搜尋與探討

The Search and Exploration of Major Transcription Factors and Regulated Genes Correlated with Tolerance to Temperature Stress of Plants

賴亭妤

## Ting-Yu Lai

指導教授:林順福 博士

Advisor: Shun-Fu Lin, Ph.D.

中華民國 106 年7月

July, 2017

# 國立臺灣大學碩士學位論文 口試委員會審定書

植物耐温度逆境主要轉錄因子及所調節基因

之搜尋與探討

# The Search and Exploration of Major Transcription Factors and Regulated Genes Correlated with Tolerance to Temperature Stress of Plants

本論文係 賴亭好 君 (R03621110) 在國立臺灣大學農藝學系、 所完成之碩士學位論文,於民國 106 年 07 月 28 日承下列考試委員審 查通過及口試及格,特此證明 口試委員:

國立臺灣大學農藝學系教授 彭雲明 博士 (召集委員)

中國文化大學園藝暨生物技術學系教授 林冠宏 博士

行政院農委會茶業改良場文山分場茶作股股長 胡智益 博士

國立臺灣大學農藝學系副教授 林順福 博士 (指導教授)

宴明



#### 致謝

這天的到來來的有點早又有點晚,轉眼間要脫離學生的生活,讓我感到開心 同時也令我不捨這一切的人、事、物。詩篇 23:4「我雖行過死蔭的幽谷,也不怕 遭害,因為你與我同在;你的杖,你的竿,都安慰我。」這經節陪伴我度過研究 生涯,在我開心、失意時都受到點醒,你的話是我腳前的燈是我路上的光,值得 一生信靠。

在這研究生涯中最感謝的是指導教授林順福老師,在我論文指導及人生方向 的指引,老師總是給予明確且開放的意見,並依每個人不同的特質給予不同的指 導,這點讓我敬佩。此外,特別感謝口試委員林冠宏老師及胡智益股長對論文的 細心審查,林冠宏老師所建議的功能性分群及胡智益股長提出的退化性引子之設 計,皆讓我的論文能夠修改得更加完善。

感謝彭雲明老師在口試當天的建議及提點,也感謝在碩士班三年間,彭老師 在資料分析及人生方向的指引,讓我在一次次的談話中感受到老師對我的關心及 展望,當我在低潮時給予一個強力的指引,使我更能堅定持續地走下去,韓愈師 說:「師者,所以傳道、授業、解惑也」,彭雲明老師及林順福老師不僅僅在傳道 授業為一個師者,也是我人生中最明亮的一盞燈照亮我人生的方向,也要感謝林 彥蓉老師兩年多的指導,事必躬親的做事態度讓我敬佩。

此外,我要感謝時常陪伴在我身邊的伙伴,感謝柔誼學姊在研究生涯陪伴我, 有屬靈同伴的代禱讓我在面臨瓶頸時,有了主的安慰及應許,感受到肢體建造的 甜美;感謝實驗室夥伴長軒、苡廷、柔瑄的陪伴,讓我在研究生涯最後一段時間 能夠得到安慰及鼓勵,特別感謝學妹冠秀,時常在我低潮時以垃圾話破題讓我情 緒回穩,接著以冷靜精闢的話語給我意見,在研究及人生課題上皆為我的良師益 友。

另外感謝四樓實驗室的女孩, 芃諭、仲汶和瀞予在碩士班趕論文的時間互相 扶持與鼓勵,每每都在拚誰是四樓最晚走的人,在這段時間有同伴的談話及陪伴 讓我碩士生涯增色了不少;還要感謝我從屏科大直升到台大的朱衍臻學弟, 有垃 圾話充斥著碩士三年,使我能夠在垃圾話中成長茁壯, 也領受到屏科大一慣的講 話風格!特別感謝在碩士班三年間, 一同與我過召會生活的社區聖徒, 尤其是黎 爸爸、黎媽媽周全柔細的照顧, 讓我在碩士期間受成全及成長。

最後,感謝爸爸媽媽的支持,在我瓶頸時以溫暖的話語扶持我向上,也供我 衣食無缺的唸完碩士班,還有弟弟妹妹的支持與鼓勵,讓我知道家才是永遠的避 風港!

感謝主,讓我在碩士班三年的時光,經歷了死蔭的幽谷,又讓我升天共享榮 耀,這段旅程真是不虛此行,畢業在即希望這時間的經歷,將會成為我未來的養 分,供我堅定持續的行向我的道路!

#### 中文摘要

全球氣候急遽變遷下,氣候因子嚴重地影響植物生長發育及面對逆境時存活 的能力,在非生物逆境中,溫度逆境對作物影響最為廣泛。許多基因調控植物在 逆境下的反應,其中轉錄因子已被證實為植物面對溫度逆境時調控之要角,近年 來,關於轉錄因子對植物在溫度逆境之調控的單一種植物或個別基因之研究甚多, 但缺乏跨物種或多種近緣基因之研究,基於此本研究蒐集植物中不同的調控溫度 逆境之轉錄因子及轉錄因子所調控基因之資料,進行綜合性的探討。

本研究於 NCBI、Brassica database、JGI、MaizeGDB 及 Phytozome 等資料庫 搜尋與溫度逆境相關之植物轉錄因子或相關基因的核苷酸及胺基酸序列,結果獲 得最多數的 HSF、WRKY、DREB/CBF 及 DREB/CBF 所調控之 COR15 基因之資 料。結果顯示多數 HSF 轉錄因子僅受高溫之影響,亦有均能受高溫及低溫影響者; 除了在小麥 TaWRKY33 轉錄因子受高溫及低溫影響外,其餘 WRKY 轉錄因子均 受低溫影響;而 DREB/CBF 轉錄因子則因植物之不同而有高溫或低溫影響之差異; 轉錄因子所調節之 COR15 基因則主要受低溫影響。

研究結果顯示單子葉與雙子葉植物間的 WRKY 轉錄因子的全基因序列長度、 高度相似性片段 G/C 所佔比率均有明顯的差異,但是在 HSF、DREB/CBF 轉錄因 子及 COR15 基因則均未有明顯差異。

針對核苷酸序列進行多重序列比較,發現三大轉錄因子及 COR15 基因在物種 間具有兩區間之連續高度相似性片段,在單子葉及雙子葉植物中皆具有高度相似 性,因此可針對連續高度相似性片段設計引子,作為篩檢三大轉錄因子及 COR15 基因在物種間之通用工具。

依據胺基酸序列高度相似性序列進行分群,結果可分為兩大群,且群間具特 有的高度相似性序列。三大轉錄因子中轉譯起始點一甲硫胺酸 (methionine) 至 DNA binding domain 之前,物種間胺基酸序列歧異度較高,而 DNA binding domain 在單子葉及雙子葉植物中均具有高度的保守性;而在三大轉錄因子之胺基酸連續 高度相似性片段,即位於轉錄因子之 DNA binding domain 上,證實核苷酸與胺基 酸序列的保守序列分別所對應的轉錄及轉譯位置的正確性,而此區域之胺基酸序 列較核苷酸序列有較高之保守性,則是因有少數遺傳字碼簡併性的發生。在阿拉 伯芥的 COR15 基因之 99 bp - 103 bp 區間的核苷酸序列亦為 DREB/CBF element 的核心保守序列 (CCGAC),說明 DREB/CBF 轉錄因子可結合 COR15 基因之核心 保守序列,進而調控 COR15 在低溫逆境下之表現,更加驗證 COR15 基因與 DREB/CBF 轉錄因子間之調控關係。 本研究剖析 HSF、WRKY、DREB/CBF 轉錄因子及 COR15 基因之核苷酸及胺基酸序列在物種間之保守性,並辨識出在植物物種間連續高度相似性之片段,並利用此片段設計引子,作為篩檢物種間三大轉錄因子及 COR15 基因之利用工具,期望結果能作為各種作物選育耐溫度逆境品系之參考。

關鍵字:溫度逆境、轉錄因子、HSF、WRKY、DREB/CBF、COR15

#### Abstract

Under the dramatic change of climate, the climatic factors seriously affect the growth and the survival rate of plants. Extreme temperature is the most diverse abiotic stress to the crops. Many genes regulating the reactions of plant under stress were reported. Transcription factors (TF) have been proven to the most important regulating factors of plant under temperature stress. However, only single plant species or particular gene related to TF for plants under temperature stress were studied in the previous studies. Studies on the TFs involving in multiple species or correlated genes are needed. Therefore, DNA or amino acid sequences of TFs related to temperature stress from various plant species were collected and analyzed in this study to obtain a comprehensive result.

Information of TFs related to temperature stress was searched from NCBI, Brassica database, JGI, MaizeGDB and Phytozome databases. Among the investigated data, TFs HSF, WRKY, and DREB/CBF as well as *COR15* gene are the most predominant. The investigated data indicate that most HSF TFs are affected only by high temperature stress, and only a few HSF TFs are affected by both high and low temperatures. Except for wheat's TaWRKY33 impacted by both high and low temperatures, all WRKY TFs are affected by low temperature. Nevertheless, DREB/CBF TFs affected by high or low temperature are varied according to different plant species. And TF regulating genes - *COR15* are affected by cold stress.

The results indicated that obvious differences between monocot and dicot plant species on whole genomic sequence length, G/C content, high similarity region, high similarity region of G/C content were observed in WRKY TFs, but not found in HSF, WRKY, DREB/CBF TFs and COR15 gene.

Due to the incessantly conservative DNA sequences of above three TF families and COR15 gene were identified by multiple sequence alignments, universal primer pairs were designed to screen the TFs or genes for diverse plant species.

Two groups of plant species in each TF family were found in the cluster analysis according to amino acid sequences, and the main divergent regions were located between the translation start point (methionine) and the downstream of binding domain. The conservative amino acid sequences were traced on the DNA binding domain, indicating the accurate corresponding regions for transcription and translation. Owing to the existence of degenerate codons, higher conservative rates were found in the amino acid sequences than the nucleic acid sequences.

The finding that the DNA sequence of 99 bp -103 bp region on COR15 gene was the same as the core conserved sequence (CCGAC) of DREB/CBF element in Arabidopsis thaliana, indicating the possible regulation system for cold stress through the binding of the two conserved sequences.

In this study, we dissected the analogous sequences of nucleic acid and amino acid of three TF families and identified high conservative regions among plant species. Based on the identified sequences, universal primer pairs were designed as a tool to screen these TF families and regulated gene COR15 for diverse plant species. The results of this study could provide basic information for selecting superior lines of various plant species with tolerance or resistance to temperature stress.

Key word: Extreme temperature 、 Transcription factor 、 HSF 、 WRKY 、 DREB/CBF 、 *COR15* 

目錄	44
口試委員審定書	i
致謝	ii
中文摘要	iii
Abstract	v
目錄	vii
表目錄	ix
圖目錄	X
一、 前言	1
二、 前人研究	3
(一) 熱休克轉錄因子 (heat shock transcription factor, HSF)	3
(二) WRKY 轉錄因子	3
(三) DREB/CBF 轉錄因子	4
(四) Cold responsive 15(COR15) 基因一由 CBF 轉錄因子所調控基因	5
三、 材料與方法	6
(一) 資料庫序列搜尋	6
(二) 核苷酸及胺基酸序列分析及親緣樹狀圖	7
四、 結果	8
(一) 資料庫序列搜尋	8
1. 基因體序列搜尋	8
(二) 核苷酸序列分析	11
<ol> <li>核苷酸序列組成分析</li> </ol>	11
<ol> <li>HSF 轉錄因子</li> </ol>	11
<ol> <li>WRKY 轉錄因子</li> </ol>	15
(3) DREB/CBF 轉錄因子	18
(4) COR15 基因	19
2. 核苷酸保守序列組成	22
<ol> <li>HSF 轉錄因子</li> </ol>	22
<ol> <li>WRKY 轉錄因子</li> </ol>	23
(3) DREB/CBF 轉錄因子	24
(4) COR15 基因	25
(三) 胺基酸保守序列組成	44
1. HSF 轉錄因子	44
2. WRKY 轉錄因子	45
3. DREB/CBF 轉錄因子	46
4. COR15 基因	47
(四) 親緣關係分析	69

	1.	HSF 轉錄因子	9
	2.	WRKY 轉錄因子	0
	3.	DREB/CBF 轉錄因子7	0
	4.	COR15 基因7	1
五、	討論	备	6
(-)		HSF 轉錄因子分析7	6
	1.	全基因序列及高度相似性區域 G/C 所佔的比率	6
	2.	核苷酸及胺基酸序列高度相似性片段7	6
	3.	親緣關係分析	7
(二)		WRKY 轉錄因子分析7	8'
	1.	全基因序列及高度相似性區域 G/C 所占的比率	8'
	2.	核苷酸及胺基酸序列高度相似性片段7	'9
	3.	親緣關係分析	0
(三)		DREB/CBF 轉錄因子分析	1
	1.	全基因序列及保守片段 G/C 所佔比率	1
	2.	核苷酸及胺基酸序列高度相似性片段8	1
	3.	親緣關係分析	3
(四)		COR15 基因與 DREB/CBF 轉錄因子之關係 8	4
	1.	序列及保守區域 G/C 所占的比率 8	4
	2.	核苷酸及胺基酸序列保守片段8	4
	3.	親緣關係分析	5
六、	結論	备	8
參考文獻			9
附錄	•••••		2

### 表目錄

表目錄	
表一、本研究所搜尋轉錄因子及所調控基因之核苷酸與胺基酸序列列表	10
表二、HSF 轉錄因子在單子葉作物中高度相似性片段、全基因序列總長與	译 1999 199 1999 1
其 G/C 所佔之比率	12
表三、HSF 轉錄因子在雙子葉植物中高度相似性片段、全基因序列總長及	
其 G/C 所佔之比率	13
表四、WRKY 轉錄因子在單子葉作物中高度相似性片段、全基因序列總長	
及其 G/C 所佔之比率	16
表五、WRKY 轉錄因子在雙子葉植物中高度相似性片段、全基因序列總長	
及其 G/C 所佔之比率	17
表六、DREB/CBF 轉錄因子在單子葉作物中高度相似性片段、全基因序列	
總長及其 G/C 所佔之比率	20
表七、DREB/CBF 轉錄因子在雙子葉植物中高度相似性片段、全基因序列	
總長及其 G/C 所佔之比率	21
表八、COR15 基因在雙子葉植物中高度相似性片段、全基因序列總長及其	
G/C 所佔之比率	22
表九、COR15 基因在單子葉作物中高度相似性片段、全基因序列總長及其	
G/C 所佔之比率	22

ix

### 圖目錄

圖目錄
圖一、HSF 轉錄因子在單子葉及雙子葉植物中核苷酸保守片段
圖二、WRKY 轉錄因子在單子葉及雙子葉植物中核苷酸保守片段
圖三、DREB/CBF 轉錄因子在單子葉作物及雙子葉植物中核苷酸保守片段 42
圖四、COR15 基因在單子葉及雙子葉植物中核苷酸高度相似性片段
圖五、HSF 轉錄因子之 DNA-BINDING DOMAIN 在植物中胺基酸高度相似性序列 52
圖六、HSF 轉錄因子之 HR-A/B DOMAIN 在植物中胺基酸高度相似性序列 58
圖七、WRKY 轉錄因子之 DNA-BINDING DOMAIN 在植物中胺基酸高度相似性序
列
圖八、DREB/CBF 轉錄因子之 DNA-BINDING DOMAIN 在植物中胺基酸保守序列. 66
圖九、COR15 基因在植物中胺基酸保守序列 68
圖十、HSF 轉錄因子胺基酸序列以鄰接法所產生單子葉及雙子葉植物之親緣關
係樹狀圖。
圖十一、WRKY 轉錄因子胺基酸序列以鄰接法所產生單子葉及雙子葉植物之親
緣關係樹狀圖。
圖十二、DREB/CBF 轉錄因子胺基酸序列以鄰接法所產生單子葉及雙子葉植物
之親緣關係樹狀圖。74
圖十三、COR15 基因胺基酸序列以鄰接法(NEIGHBOR JOINING METHOD)產生單子葉
及雙子葉植物之親緣關係樹狀圖。75

一、前言

近年來全球氣候急遽變遷,而氣候變遷則增強植物生長發育時的環境壓力, 常見的環境壓力包括乾旱、淹水、高溫及低溫等非生物逆境,當逆境發生時將影 響作物的存活、產量及品質 (Wang *et al.*, 2013),為了因應環境的挑戰,植物演化 出一套複雜的分子網絡 (molecular networks)以適應極端氣候 (Bohnert *et al.*, 1995; Ross *et al.*, 2007; Rashid *et al.*, 2012)。其中轉錄調控機制 (transcription regulation mechanisms) 在 植 物 體 中 扮 演 面 對 逆 境 時 調 適 植 物 體 發 育 的 重 要 角 色 (Mukhopadhyay *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2011)。

溫度逆境對作物之影響最為普遍,故被視為影響作物生產最重要的非生物逆 境,在植物面對溫度逆境時大量的基因產生調節反應(Akhtar et al., 2015),而其轉 錄因子則為植物在逆境時主要的調控角色。近年來關於轉錄因子的研究甚多,在 人類、動物及植物中皆有研究,在人類研究中,轉錄因子調節系統過表現或失去 功能將影響到癌症發生及人類發育功能障礙 (Vaquerizas et al., 2009),在植物中, 轉錄因子已被證實為植物面對多重非生物逆境時的調控角色,常見的逆境調控轉 錄因子有 AP2/ERFBP、HSF、MYB、WRKY、NAC、DREB/CBF 及 bZIP 等家族 (Wang et al., 2016),其中 WRKY 轉錄因子僅發現在植物中 (Zhou et al., 2008),而 HSF (heat shock transcription factor, HSF) 轉錄因子則為植物面對高溫逆境時重要的調控因子 (Lin et al., 2011)。此外,DREB/CBF 轉錄因子所調控之下游 COR (cold-responsive) 基因,亦為植物面對低溫逆境時的調控基因 (Zhou et al., 2012),上述的調控因子 及其下游基因皆為植物在面對逆境時自我調控的要角。

近年來有關植物在溫度逆境下轉錄因子的重要研究,包括水稻熱休克轉錄因 子(heat shock transcription factor, HSF)在對高溫、低溫逆境時調控機制及表現量 (Mittal *et al.*, 2009);及小麥的 WRKY 轉錄因子對低溫逆境時之表現量 (Wang *et al.*, 2013),結果皆顯示在溫度逆境下水稻熱休克轉錄因子 (HSF) 及小麥的 WRKY 轉 錄因子皆有高度的表現量;在小麥的 AP2/ERFBP 家族之 TaPIE1 過表現可提升小 麥在9℃及-9℃低溫逆境下之耐受性,存活率較一般小麥之高出50%-70% (Zhu et al., 2014)。將大豆的 GmMYBJ1(MYB 家族)轉殖至阿拉伯芥中,可提升阿拉伯 芥對乾旱及低溫逆境(4℃)之耐受性 (Su et al., 2014)。小麥的 TaWRKY93 (WRKY 家族)轉殖至阿拉伯芥中,可提升阿拉伯芥對鹽害、乾旱及低溫逆境之耐受性 (Qin et al., 2015)。NAC 家族的 OsNAP 在水稻中過表現,可提升低溫、鹽害、乾旱的耐 受性 (Chen et al., 2012);將大豆的 GmbZIP1 轉殖至菸草中,可提升菸草的乾旱、 鹽害、寒害的耐受性,由多篇研究可知,轉錄因子可提升植物在逆境下之耐受性。

近十年來,調控溫度逆境相關轉錄因子之研究不斷的被提出,但皆為個別基因、轉錄因子的研究,缺乏綜合性的研究,無法了解這些因子間之共同點或差異 之處,基於此,本研究蒐集植物中不同的調控溫度逆境之轉錄因子及轉錄因子之 調控基因資料,進行綜合性的分析與研究。

由於在所蒐集與溫度逆境相關之轉錄因子中以 HSF、WRKY、DREB/CBF 三 大轉錄因子及 COR15 基因佔最多數目,利於比對及分析,故為本研究重點。即可 在不同植物中找出核苷酸序列在物種間的保守性,進而劃分出高度相似性片段, 找出在物種間之共同連續片段,並可依據此連續高度相似性片段設計引子,作為 篩選各種物種之 HSF、WRKY、DREB/CBF 三大轉錄因子及 COR15 基因之工具, 並針對核苷酸及胺基酸序列進行多重序列比較分析,以建立親緣關係樹圖,探討 植物物種間溫度逆境轉錄因子之遺傳相似性,期望結果能提供作物溫度逆境研究 之參考或應用。

2

#### 二、前人研究

轉錄因子已被證實為植物面對多重非生物逆境時的調控角色,本研究所搜尋 之轉錄因子大多為 HSF、WRKY 及 DREB/CBF 之轉錄因子家族,並針對 HSF、 WRKY 及 DREB/CBF 三大轉錄因子與 CBF 轉錄因子所控制之 COR15 基因進行更 深入的探討。

(一)熱休克轉錄因子 (heat shock transcription factor, HSF)

熱休克轉錄因子為植物體面對高溫逆境時的重要調控因子,為熱逆境剛發生時初級的反應分子,可活化熱休克蛋白的表現(Wu, 1995)。與其他的轉錄因子相似, HSF 有其模式結構 (modular structure),HSF 轉錄因子由 N 端至 C 端常見的中心結 構為具 Helix-turn-Helix 組成的 DNA 鍵結區 (DNA binding domain, DBD)、具七重 複疏水性組成(heptad hydrophobic repeat, HR A/B)之 adjacent domain 及由短胜肽模 組(motif)組成的核定位信號區(unclear localization signal, NLS),偶有些 HSF 轉錄因 子在 C 端處具有核輸出信號 (nuclear export signal, NES) 及 AHA 型的 activation domain (Kotak *et al.*, 2004)。根據上述之基本結構及演化上的保守性分類,植物的 熱休克轉錄因子,可分為 A、B、C 三大群,具有 21 個胺基酸殘基插入 HR A/B 區 的為 A 群,而無序列插入 HR A/B 區的為 B 群,7 個胺基酸殘基插入 HR A/B 區的 C 群 (Nover *et al.*, 2001)。

近年來的研究指出,熱休克轉錄因子可調控植物在逆境下的耐受性,包括高 溫逆境 (Guo et al.,2008; Hu et al., 2009; Mittal et al., 2009)、低溫逆境 (Li et al., 2003; Hu et al., 2009; Mittal et al., 2009)、鹽害逆境 (Yokotani et al., 2008; Hu et al., 2009)、乾旱逆境 (Hu et al., 2009) 及氧化逆境 (Li et al., 2005; Mittal et al., 2009; Liu et al., 2009)等。

(二)WRKY 轉錄因子

WRKY 轉錄因子為植物特有的轉錄調控因子,在植物中有龐大的基因家族,如野生燕麥 (Rushton et al., 1995)、馬鈴薯 (Dellagi et al., 2000)、大麥 (Sun et al.,

2003)、胡椒 (Oh et al., 2006)、水稻 (Ramamoorthy et al., 2008)等。WRKY 轉錄 因子可辨別的最顯著特色為具有 WKRY domain 及 Zinc-finger motif;其中 WRKY domain 由 60 個胺基酸組成,在此 WRKY domain 的 N 端具高度保守之 WRKYGQK motif,而位於 C 端的 Zinc finger motif 則具 C2H2(Cys2His2)或 C2HC(Cys2HisCys) 兩種型態 (Eulgem et al., 1999),因此依據 WRKY Domain 的數目及 Zinc-finger motif 的型態可將 WRKY 轉錄因子分為三群,第一群有兩個 WRKY Domain,第二、第 三群皆只有一個 WRKY Domain (Yang et al., 2009);第一及第二群具有 C2H2 型的 Zinc finger motif,而第三群則為 C2HC 型的 Zinc-finger motif (Eulgem et al., 1999)。

在許多的研究指出 WRKY 蛋白質參與植物面對非生物逆境之反應, WRKY 轉錄因子在阿拉伯芥面對鹽害、乾旱、寒害等非生物逆境時,具有強烈的調節反應 (Karam et al., 2002; Motoaki et al., 2002; Kilan et al., 2007);且當水稻面對乾旱、鹽 害逆境及多種植物賀爾蒙處理時,54 個 WRKY 轉錄因子均具有顯著的調節反應 (Ramamoorthy et al., 2008);而大麥 Hv-WRKY38 轉錄因子則在低溫及乾旱逆境下 均有表現 (Mare et al., 2004);但是大豆9個 WRKY 轉錄因子在非生物逆境下則具 有不同的表現程度 (Zhou et al., 2008)。

(三)DREB/CBF 轉錄因子

DREB/CBF (Dehydration responsive / C-repeat element binding factor) 轉錄因子 家族為第一個在缺水逆境下被發現的轉錄因子,與其他轉錄因子相比,DREB/CBF 轉錄因子最大的特點為具有 AP2 domain。AP2 domain 最早在阿拉伯芥的 APETALA2 蛋白中被發現。AP2 domain 由 60 個胺基酸組成,具高度保守性的 DNA-binding motif,這類群的轉錄因子控制許多被逆境誘導基因的表現 (Thomashow *et al.*, 2001; Agawal *et al.*, 2006; Gao *et al.*, 2007; Kim, 2007), 許多的 DREB/CBF 可被乾旱 (Qin *et al.*, 2007)、鹽害 (Dubouzet *et al.*, 2003)、低溫 (Qin *et al.*, 2004)、高溫逆境 (Schramm *et al.*, 2008)等逆境所誘導。

具有 AP2 domain 的轉錄因子, 被歸為 AP2/EREBP

4

(APETALA2/ethyleneresponsie element binding protein)轉錄因子家族 (Okamuro et al., 1995; Riechmann and Meyerowitz, 1998)。在阿拉伯芥基因體編碼 145 個 AP2/EREBP 胺基酸家族,並依據 DNA-binding domain 的型態而分群 (Sakuma et al., 2002),第一群為具有兩個 AP2 domain 的 AP2 亞科、第二群為只有一個 AP2 domain 及一個 B3 DNA-binding domain 的 RVA 亞科、第三群為只有一個 AP2 domain 及 CBF 因子的 CBF/DREB2/ERF 亞科,在 CBF 亞科中 DREB2/ERF 又被劃分在另一群,其最明顯可辨別的特徵為具有 PKKP/RAGRxxKFxETRHP(PKKPAGR)及 DSAWR 胺基酸序列(Jaglo et al., 2001; Canella et al., 2010)。

(四)Cold responsive 15(COR15) 基因一由 CBF 轉錄因子所調控基因

CBF (C-repeat element binding factor)轉錄因子訊號傳導途徑牽涉到複雜的基 因調控網絡,被認為高等植物面對低溫逆境時主要的調控因子,CBF 轉錄因子藉 由 CBF element 核心保守序列(CCGAC)與 cold-responsive 基因結合以調控 cold-responsive 基因的表現 (Baker *et al.*, 1994; Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 1994; Thomashow, 1999; Thomashow, 2001)。研究指出,阿拉伯芥的 *AtCOR15a* 基 因顯著提升阿拉伯芥面對低溫逆境時的耐寒能力 (Artus *et al.*, 1996),許多的 *AtCOR15a* 同源基因在其他植物物種中被發現,也被證實具有耐寒能力 (Zhou *et al.*, 2011)。在大麥、小麥及油菜中,COR 同源基因在葉片中被偵測及表現 (Cattivelli and Bartels, 1990; Lin *et al.*, 1992; Chauvin *et al.*, 1993; Weretilnyk *et al.*, 1993)。由此可知, *COR15a* 基因為高等植物在低溫逆境調控機制網絡的要角。

综合上述研究可知,HSF、WRKY、DREB/CBF 轉錄因子及 CBF 轉錄因子調 控的 COR15 基因,均為植物面對溫度逆境時之重要調控因子,因此有必要針對 HSF、WRKY、DREB/CBF 轉錄因子及 COR15 基因進行物種間之探討,作為作物 改良耐溫度逆境能力之參考。

5

#### 三、材料與方法

本研究分為兩大主軸,第一主軸為搜尋已知資料庫之植物與耐溫度逆境相關 之轉錄因子,包括 HSF、WRKY、DREB/CBF 等轉錄因子及 COR15 等基因在各植 物物種中的核苷酸及胺基酸序列進行判別及比對,第二主軸為針對植物物種之核 苷酸及胺基酸進行多重序列比較分析,並以分析結果劃分出核苷酸及胺基酸在物 種間的保守序列,以設計物種均可適用之引子對。

(一)資料庫序列搜尋

(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/) 
Brassica 本研究自 NCBI database (http://brassicadb.org/brad/) JGI (http://jgi.doe.gov/) **MaizeGDB** (https://www.maizegdb.org/) 
Phytozome (https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html) 等資料庫搜尋多種轉錄因子及轉錄因子調控之基因,包括 HSF (von Koskull-döring et al., 2007; Guo et al., 2008; Mittal et al., 2009; Lin et al., 2011; Li et al., 2014; Song et al., 2014; Tang et al., 2016; Yang et al., 2016;) WRKY (Hwang et al., 2005; Ramamoorthy et al., 2008; Zhou et al., 2008; Ling et al., 2011; Wang et al., 2013; Chen et al., 2015; Wang et al., 2015; He et al., 2016) . DREB/CBF (Seki et al., 2001; Dubouzet et al., 2003; Kim et al., 2004; Qin et al., 2004; Xiong and Fei et al., 2006; Oin et al., 2007; Morran et al., 2011; Chen et al., 2012; Akhtar et al., 2015; Kidokoro et al., 2015; Huang et al., 2015; Huang et al., 2016) 
 bZIP (Zhang et al., 2009) 
 MYB (Afrin et al., 2015)及 CBL-CIPK (Zhang et al., 2014)等轉錄因子家族,及 DREB/CBF 所調控之 COR15 基因 (Weretilnyk et al., 1993; Seki et al., 2001; Talanova et al., 2009; Zhou et al., 2012; Liang et al., 2013), 在所搜尋之轉錄因子及轉錄因子所調控之基因 中,HSF、WRKY、DREB/CBF 三大轉錄因子及 COR15 基因佔大多數,且所涵蓋 的物種較多,因此針對 HSF、WRKY、DREB/CBF 轉錄因子及 COR15 基因,搜尋 並分析在各植物物種間之核苷酸與胺基酸序列。其中 HSF 轉錄因子搜尋的植物物 種包括阿拉伯芥(Arabidopsis thaliana)及白菜 (Brassica rapa)等兩種十字花科植物,

屬於豆科植物之大豆 (Glycine max),番茄 (Solanum lycopersicum)及馬鈴薯 (Solanum tuberosum)等雨種茄科作物,水稻 (Oryza sativa)及玉米 (Zea mays)等雨種 禾本科作物。WRKY 轉錄因子搜尋的植物物種包括辣椒 (Capsicum annuum)、番 茄 (Solanum lycopersicm)等雨種茄科作物,大豆 (Glycine max)豆科作物,黄瓜 (Cucumis sativus)葫蘆科作物,水稻 (Oryza sativa)及小麥 (Triticum aestivum)等雨種 禾本科作物; DREB/CBF 轉錄因子搜尋的植物物種包括寬葉獨行菜(Lepidium latifolium)、阿拉伯芥 (Arabidopsis thaliana)等雨種十字花科植物,花生 (Arachis hypogaea)、大豆 (Glycine max)等雨種豆科作物,水稻(Oryza sativa)、小麥 (Triticum aestivum)、玉米(Zea mays)、多年生黑麥草(Lolium perenne)等四種禾本科作物,繫 粮 (Capsicum annuum)茄科作物,野胡蘿蔔(Daucus carota)繳型花科作物,罌粟花 (Papaver nudicaule)等罌粟花科作物; COR15 基因搜尋的植物物種包括阿拉伯芥 (Arabidopsis thaliana)、油菜(Brassica napus)、薺菜(Capsella bursa-pastoris)、亞麻 薺(Camelina sativa)等四種十字花科植物,小麥 (Triticum aestivum)禾本科作物,搜 尋之核苷酸及胺基酸序列蒐錄於附錄一。

(二)核苷酸及胺基酸序列分析及親緣樹狀圖

將資料庫所搜尋之序列,以 MEGA (Molecular Evolution Genetic Analysis) 7.0.2.1 版軟體 (Kumar *et al.*, 2016)進行核苷酸、胺基酸多重序列比較 (Mutiple Sequence Alignment, MUSCLE) (Edgar, 2004)及 cluster W 分析,排列後的序列轉存 成 FASTA 檔,並進一步進行序列分析,以 MEGA 7.0.2.1 版本的 Sequence Data Explorer 劃分出胺基酸及核苷酸序列保守片段。親緣樹狀圖的建立是將排列後的胺 基酸序列以鄰接法 (neighbor joining method)繪製親緣關係樹圖 (Saitou and Nei, 1987)。

doi:10.6342/NTU201703083

7

四、結果

(一)資料庫序列搜尋

1. 基因體序列搜尋



本試驗使用 NCBI、Brassica database、JGI、MaizeGDB 及 Phytozome 等資料 庫,搜尋之與溫度相關轉錄因子與轉錄因子調控基因共有132.902個,其中最多者 為 HSF、WRKY、DREB/CBF 三大轉錄因子及 DREB/CBF 所調控之 COR15 基因, 搜尋結果得到HSF 轉錄因子家族共有 3840 個物種、WRKY 轉錄因子家族共有 6315 個物種、DREB/CBF 轉錄因子家族 6115 個物種之序列及 COR15 基因共 43 個物種 之序列。並依據前人研究(表一)結果,選取具耐溫度逆境之轉錄因子及基因。HSF 轉錄因子選定物種為禾本科的水稻(稉稻)及玉米,十字花科的阿拉伯芥及白菜,茄 科的番茄及馬鈴薯,豆科的大豆,共7種物種包含57個轉錄因子以進行核苷酸及 胺基酸序列分析,作物核苷酸序列總長在 651 bp – 8272 bp 間、胺基酸總長在 205 aa - 641 aa 間 (表二、表三),其中核苷酸及胺基酸序列以水稻的 OsHSFA2C 最長,物 種間序列總長差異大。WRKY 轉錄因子選定物種為禾本科的水稻及小麥,茄科的 番茄及辣椒,葫蘆科的黃瓜及豆科的大豆,共6種物種23個轉錄因子進行核苷酸、 胺基酸序列分析,核苷酸序列總長介於 591 bp – 15535 bp 間、胺基酸序列介於 174 aa – 631 aa 間 (表四、表五), 而核苷酸序列以水稻的 Os WRKY102 最長, 胺基酸序 列以番茄的 SIWRKY53 最長,物種間序列總長差異大。DREB/CBF 轉錄因子選定 之物種包括禾本科的水稻、小麥、玉米及多年生黑麥草,十字花科的阿拉伯芥及 寬葉獨行菜,茄科的辣椒,繳形花科的野胡蘿蔔,罌粟科的罌粟花及豆科的花生、 大豆,共11 種物種23 個轉錄因子以進行核苷酸及胺基酸序列分析,其核苷酸序 列總長介於 567 bp – 3366 bp 間、胺基酸序列總長介於 156 aa – 407 aa 間 (表六、 表七),核苷酸序列以玉米的 ZmDREB2A 最長,胺基酸序列以花生的 AhERF6 最長, 物種間序列總長差異大。COR15 基因獲得十字花科的阿拉伯芥、油菜、薺菜及亞 麻薺以及禾本科的小麥,共5種物種5個基因進行序列分析,其物種間核苷酸序

列總長介於 686 bp - 5641 bp 間、胺基酸序列介於 104 aa - 147 aa 間 (表八、表九), 其中核苷酸序列以油菜的 BnCor15B 最長,胺基酸序列則以油菜的 BnCor15B 及小 麥的 WCor15 最長,物種間核苷酸序列總長度差異大,胺基酸序列總長相近。核苷 酸及胺基酸序列在不同的轉錄因子及基因中,隨著物種之不同有極大的差異。

genes used in this study		T A m
類別	物種 DNA 序列	物種胺基酸序列
HSF 轉錄因子	水稻 (7個)	水稻 (9個)*
	玉米 (11 個)	玉米 (12個)*
	阿拉伯芥 (7個)	阿拉伯芥 (9個)*
	白菜 (11 個)	白菜 (11 個)
	大豆 (10 個)	大豆 (10 個)
	馬鈴薯 (3個)	馬鈴薯 (3個)
	番茄 (8 個)	番茄 (8 個)
WRKY 轉錄因子	辣椒 (1 個)	辣椒 (1 個)
	番茄 (9 個)	番茄 (9 個)
	黄瓜 (7個)	黄瓜 (7個)
	大豆 (1個)	大豆 (1個)
	小麥 (9 個)	小麥 (9 個)
	水稻 (9個)	水稻 (9個)
DREB/CBF 轉錄因子	花生 (3 個)	花生 (3 個)
	大豆 (7個)	大豆 (8個)*
	阿拉伯芥 (1個)	阿拉伯芥 (1個)
	辣椒 (1 個)	辣椒 (1 個)
	野胡蘿蔔 (1個)	野胡蘿蔔 (1個)
	寬葉獨行菜 (1個)	寬葉獨行菜 (1個)
	多年生黑麥草 (1個)	多年生黑麥草 (1個)
	水稻 (2個)	水稻 (2個)
	罌粟花 (1 個)	罌粟花 (1個)
	小麥 (2 個)	小麥 (2 個)
	玉米 (2個)	玉米 (7個)*
COR15 基因	阿拉伯芥 (1個)	阿拉伯芥 (2個)*
(DREB/CBF 轉錄因子調控)	油菜 (1 個)	油菜 (2個)*
	薺菜 (1個)	薺菜 (1 個)
	亞麻薺 (1個)	亞麻薺 (1個)
	小麥 (1 個)	小麥 (1 個)

表一、本研究所搜尋轉錄因子及所調控基因之核苷酸與胺基酸序列列表 Table 1. The DNA and animo acid sequences of transcription factors and the regulated

\*轉錄因子或所調控之基因胺基酸序列具 homology

(二)核苷酸序列分析

1. 核苷酸序列組成分析



本試驗以 MEGA7.0 軟體進行多重序列比較分析 (multiple sequence alignment, MUSCLE),進而分析 HSF、WRKY、DREB/CBF 轉錄因子及 CBF 轉錄因子調控 之 COR15 基因之保守片段組成。

(1) HSF 轉錄因子

HSF 轉錄因子在單子葉作物中序列總長介於 1377 bp (ZmHSF20) - 8272 bp (OsHSFA2C)之間,全基因的 G/C 所佔比率介於 40.3% (ZmHSF14) - 64.2% (ZmHSF12)間,在高度相似性片段中,片段總長在 651 bp (ZmHSF20) - 761bp (ZmHSF24)之間,高度相似性片段 G/C 所佔的比率介於 52.3% (ZmHSF9)-67.7% (ZmHSF12)之間,相較全基因序列,高度相似性片段總長、高度相似性片段 G/C 所佔的比率在單子葉作物中差異不大,在玉米之HSF轉錄因子均僅受高溫之影響, 而水稻則受高溫及低溫之影響或僅受高溫之影響 (表二);在雙子葉植物中全基因 序列總長介於 747 bp (BrHsf-15) - 6119bp (StHSFA3) 之間,全基因所佔 G/C 的比率 介於 29.6% (SlHsfB-2a-like) - 55.5%(BrHsf-01)之間,在高度相似性片段中,片段 總長介於 445 bp (BrHsf-23) – 534 bp (AtHsfA1b 及 SlHsfA1a)之間,高度相似性片段 G/C 所佔的比率在 29.1% (SlHsfB-2a-like) - 51.9% (BrHsf - 01)之間,相較於高度 相似性片段總長,全基因序列總長及全基因所佔之 G/C 的比率在不同物種間相差 甚大,高度相似性片段 G/C 所佔比率與全基因所佔之 G/C 的比率相近 (表三),在 阿拉伯芥及大豆之 HSF 轉錄因子僅受高溫之影響,而在白菜、番茄及馬鈴薯等物 種之 HSF 轉錄因子則同時受高溫及低溫之影響,亦有僅受高溫影響者。與單子葉 作物相比,雙子葉植物全基因、高度相似性片段所佔 G/C 的比率差異較大。在高 度相似性片段總長中,單子葉作物平均總長為 725.8 bp,雙子葉植物平均總長為 511 bp;單子葉作物高度相似性片段所佔 G/C 的比率平均值為 60.9 %,雙子葉植 物平均值為 42.7 %;單子葉作物全基因序列總長平均為 3268.6 bp,雙子葉植物全

基因序列總長平均為2509 bp;單子葉作物全基因 G/C 所佔比率平均值為53.6%, 雙子葉植物全基因 G/C 所佔的比率平均值為40.9%,在單子葉作物中,全基因序 列總長、高度相似性片段總長、全基因 G/C 所佔比率及高度相似性片段 G/C 所佔 比率之平均值較雙子葉植物高,此為單子葉作物與雙子葉作物差異處。

表二、HSF 轉錄因子在單子葉作物中高度相似性片段、全基因序列總長與其 G/C 所佔之比率

Table 2. The length and G/C content of whole genomic and high similarity sequences in HSF of transcription factors in monocotyledons.

甘田	受高温或低温或	高度相似性序列		全基因序列	
本囚	兩者之影響	總長度(bp)	G/C 所佔比率(%)	總長(bp)	G/C 所佔比率(%)
OsHSFA2A	H/L	749	63.2	2594	55.9
OsHSFA2C	Н	757	57.8	8272	42.2
OsHSFA2D	H/L	737	57.7	6370	43.0
OsHSFB2A	Н	668	65.0	1705	58.9
OsHSFC2A	H/L	703	66.3	1493	61.9
OsHSFC2B	H/L	671	65.9	2529	52.3
ZmHSF2	Н	739	54.0	2408	49.1
ZmHSF4	Н	757	54.4	4020	47.0
ZmHSF6	Н	749	57.2	3446	52.8
ZmHSF7	Н	713	64.6	1745	63.6
ZmHSF8	Н	721	64.1	1680	62.6
ZmHSF9	Н	758	52.3	4462	41.9
ZmHSF10	Н	728	63.9	1891	61.9
ZmHSF12	Н	699	67.7	1474	64.2
ZmHSF13	Н	746	64.9	2325	57.5
ZmHSF14	Н	757	53.3	7416	40.3
ZmHSF20	Н	651	65.6	1377	61.9
ZmHSF24	Н	761	58.1	3628	47.8
平均		725.8	60.9	3268.6	53.6
範圍		651 – 761	52.3 - 67.7	1377 - 8272	40.3 - 64.2

註: Os 為水稻, Zm 為玉米。

表三、HSF 轉錄因子在雙子葉植物中高度相似性片段、全基因序列總長及其 G/C 所佔之比率

Table 3. The length and G/C content of whole genomic and high similarity sequences of transcription factors HSF in dicotyledons.

# m	受高溫或低溫或	高度相	目似性序列	全基因序列		
基因	雨者之影響	總長度(bp)	G/C所佔比率(%)	總長度(bp)	G/C 所佔比率(%)	
AtHsfA1a	Н	531	41.0	1829	40.4	
AtHsfA1b	Н	534	40.7	2695	40.0	
AtHsfA1d	Н	533	40.4	3508	38.2	
AtHsfA1e	Н	533	43.8	3001	40.2	
AtHSFA2	Н	526	44.2	2169	38.5	
AtHsfB1	Н	500	43.4	1975	38.6	
AtHsfB2a	Н	521	42.2	1837	38.6	
BrHsf-01	H/L	457	51.9	858	55.5	
BrHsf-10	H/L	502	46.2	1047	48.6	
BrHsf-11	H/L	471	47.6	951	52.0	
BrHsf-15	Н	451	43.9	747	47.0	
BrHsf-16	H/L	458	44.8	810	47.1	
BrHsf-20	H/L	519	40.8	1224	41.4	
BrHsf-23	Н	445	49.2	930	51.9	
BrHsf-24	H/L	517	41.6	1155	44.8	
BrHsf-25	H/L	477	43.8	1008	46.3	
BrHsf-29	H/L	525	44.0	1464	45.8	
BrHsf-35	H/L	477	47.1	1074	54.0	
GmHSF04	Н	530	43.0	2691	38.4	
GmHSF08	Н	533	43.5	1999	41.7	
GmHSF09	Н	520	42.5	4870	36.7	
GmHSF10	Н	531	40.1	2768	36.9	
GmHSF11	Н	517	40.3	1458	40.8	
GmHSF16	Н	488	47.1	1665	41.1	
GmHSF17	Н	531	46.6	3436	40.3	
GmHSF25	Н	525	46.6	2590	38.7	
GmHSF33	Н	532	44.2	4958	38.5	
GmHSF34	Н	504	45.1	2916	34.7	
SIHSF24	Н	522	42.1	3285	34.6	

(續	表	三)	
("R	1	-,	

(領衣二)					· 注意:
t 田	受高温或低温或	高度相似性序列		全基因序列	
至四	兩者之影響	總長度(bp)	G/C 所佔比率(%)	總長度(bp)	G/C所佔比率(%)
SlHsf30	Н	529	39.9	2886	37.2
SlHsfA1a	Н	534	44.6	5452	39.4
SIHSFA3	Н	517	41.4	5160	39.4
SIHSFA4A	Н	525	35.7	4394	33.9
SlHsfA6B	Н	533	35.3	2649	31.8
SlHsfB-2a-like	Н	514	29.1	2633	29.6
SlHsfB4	Н	503	38.0	1431	34.6
StHSF30	Н	525	39.7	2207	38.0
StHSFA3	Н	517	40.8	6119	39.7
StHSFA5	H/L	521	44.5	4009	38.7
平均		511	42.7	2509	40.9
範圍		445 - 534	29.1 - 51.9	747 – 6119	29.6 - 55.5

註: At 為阿拉伯芥, Br 為白菜, Gm 為大豆, Sl 為番茄, St 為馬鈴薯。

(2) WRKY 轉錄因子

WRKY 轉錄因子在單子葉作物中全基因序列總長介於 600 bp (TaWRKY52) 15535 bp (OsWRKY102)之間,全基因所佔 G/C 比率在 39.2% (OsWRKY102) - 70.5 % (TaWRKY53)之間,在作物中高度相似性片段總長介於 334bp (TaWRKY52) - 414 bp (OsWRKY62)之間,高度相似性片段所佔 G/C 比率在 54% (TaWRKY44) - 74.8% (OsWRKY68)之間 (表四),相較於高度相似性片段及高度相似性片段 G/C 所佔的比 率,全基因序列總長及所佔的 G/C 比率差異甚大,在單子葉之 WRKY 轉錄因子中 除小麥之 TaWRKY33 轉錄因子為同時受高溫及低溫影響之外,其他之水稻及小麥 WRKY 轉錄因子均僅受低溫影響;雙子葉植物中全基因序列總長介於 591 bp (GmWRKY21) - 5702bp (SlWRKY33)之間,所佔 G/C 比率在 28.7% (SlWRKY62) -49.1% (CsWRKY25)之間,高度相似性片段在雙子葉植物中總長介於 298 bp (GmWRKY21) - 391 bp (SIWRKY52)間,高度相似性片段所佔 G/C 比率在 21.9% (SIWRKY26)-43.6% (CsWRKY25)間 (表五), 雙子葉植物全基因序列總長、G/C 所 佔的比率及高度相似性片段 G/C 所佔比率在物種間差異極大,但全基因與高度相 似性片段 G/C 所佔比率差異範圍接近,而高度相似性片段總長在雙子葉植物物種 間相近,在雙子葉包括辣椒、黃瓜、大豆及番茄等作物之 WRKY 轉錄因子均僅受 低温之影響。WRKY 轉錄因子在單子葉作物中全基因序列總長、全基因序列 G/C 所佔比率,高度相似性片段總長、高度相似性片段 G/C 所佔的比率較雙子葉植物 差異大。在單子葉作物中高度相似性片段平均為 394.8 bp, 雙子葉植物高度相似性 片段平均為 362.3 bp; 全基因序列總長單子葉作物平均為 2327.8 bp, 雙子葉植物 平均為 2326.3 bp, 高度相似性片段與全基因總長在單子葉作物及雙子葉植物中平 均值相近。單子葉作物高度相似性片段 G/C 所佔比率平均為 69.2%, 雙子葉植物 高度相似性片段 G/C 所佔比率平均為 33.6%; 全基因 G/C 所佔比率, 單子葉作物 平均值 58.8%、雙子葉植物平均值為 39.6%,在高度相似性片段及全基因的 G/C 所佔比率,單子葉作物中較雙子葉植物平均值高。

表四、WRKY 轉錄因子在單子葉作物中高度相似性片段、全基因序列總長及其 G/C 所佔之比率

Table 4. The length and G/C content of whole genomic and high similarity sequences of transcription factors WRKY in monocotyledons.

# E1	受高温或低温或	高度相似性序列		全基因序列	
<b>坐</b> 四	兩者之影響	總長度(bp)	G/C 所佔比率(%)	總長度(bp)	G/C 所佔比率(%)
OsWRKY79	L	411	66.9	2230	54.1
OsWRKY74	L	408	68.6	2312	53.0
OsWRKY68	L	405	74.8	1403	62.1
OsWRKY66	L	412	72.3	4151	45.1
OsWRKY62	L	414	65.0	2086	52.6
OsWRKY51	L	413	72.9	1894	60.4
OsWRKY45	L	410	67.8	2222	54.7
OsWRKY39	L	407	73.2	2356	55.8
OsWRKY102	L	413	65.4	15535	39.2
TaWRKY53	L	403	73.2	942	70.5
TaWRKY52	L	334	65.2	600	61.3
TaWRKY51	L	361	69.2	672	69.4
TaWRKY50	L	359	70.7	876	67.0
TaWRKY48	L	407	71.0	978	66.1
TaWRKY46	L	383	68.4	791	65.6
TaWRKY44	L	393	54.0	1113	46.2
TaWRKY33	H/L	402	73.7	1071	67.6
TaWRKY10	L	371	73.1	669	68.5
平均		394.8	69.2	2327.8	58.8
範圍		334 - 414	54.0 - 74.8	600 - 15535	39.2 - 70.5

註: Os 為水稻, Ta 為小麥。

表五、WRKY 轉錄因子在雙子葉植物中高度相似性片段、全基因序列總長及其 G/C 所佔之比率

Table 5. The length and G/C content of whole genomic and high similarity sequences of transcription factors WRKY in dicotyledons.

"墨,擘

	受高温或低温或	高度	高度相似性序列		全基因序列	
举凶	兩者之影響	總長(bp)	G/C 所佔比率(%)	總長(bp)	G/C 所佔比率(%)	
CaWRKY1	L	363	34.8	1646	41.0	
CsWRKY18	L	321	38.3	1011	48.5	
CsWRKY21	L	337	33.8	948	42.7	
CsWRKY23	L	372	31.9	1359	44.1	
CsWRKY25	L	330	43.6	1053	49.1	
CsWRKY33	L	328	40.2	1152	47.1	
CsWRKY4	L	383	40.5	1521	45.1	
CsWRKY46	L	313	40.9	786	46.3	
GmWRKY21	L	298	37.9	591	44.0	
SIWRKY2	L	385	29.6	2457	33.2	
SIWRKY26	L	388	21.9	4196	29.2	
SIWRKY27	L	390	24.3	3173	29.3	
SIWRKY33	L	389	34.5	5702	37.8	
SIWRKY52	L	391	33.0	4075	36.9	
SIWRKY53	L	390	33.6	3295	37.7	
SIWRKY56	L	389	29.9	5112	37.0	
SIWRKY60	L	377	30.5	1721	35.8	
SIWRKY62	L	377	25.0	2075	28.7	
平均		362.3	33.6	2326.3	39.6	
範圍		298 - 391	21.9 - 43.6	591 - 5702	28.7 - 49.1	

註: Ca 為辣椒, Cs 為黃瓜, Gm 為大豆, SI 為番茄。

(3) DREB/CBF 轉錄因子

DREB/CBF 轉錄因子在單子葉作物中全基因序列總長介於 895 bp (OsDREB1A) - 3366 bp (ZmDREB2A)之間,全基因序列G/C所佔的比率介於45.5 % (ZmDREB2A) 67.2 % (OsDREB1A)之間,作物中高度相似性片段總長介於607 bp (OsDREB1B) - 666 bp (ZmDREB2A)之間,高度相似性片段 G/C 所佔的比率介於 56.8 % (ZmDREB2A)-70.6% (TaDREB3)之間,可知在單子葉作物中全基因的序列總長在 物種間差異大,全基因序列 G/C 所佔的比率、高度相似性片段 G/C 所佔比率在物 種間差異極大,而全基因序列 G/C 所佔的比率範圍較高度相似性片段大 (表六), 在單子葉之多年生黑麥草及水稻之 DREB/CBF 轉錄因子僅受低溫之影響,而在玉 米及部分小麥DREB/CBF轉錄因子則同時受高溫及低溫之影響。在雙子葉植物中, 全基因的序列總長介於 567 bp (GmDREB1E-1) - 2803 bp (GmDREB1C-1)之間,全 基因序列G/C所佔比率介於38.1% (GmDREB1C-1)-55.2% (GmDREB1B-1)之間, 高度相似性片段總長介於 277 bp (DcDREB-A6) – 314 bp (GmDREB1C-1 及 AhERF6) 之間,高度相似性片段 G/C 所佔的比率介於 45.9% (AhERF5) - 55.7% (GmDREB1B-1)之間,與高度相似性片段相比,全基因序列總長及全基因 G/C 所佔 的比率在物種間差異大 (表七),在雙子葉之落花生、阿拉伯芥、寬葉獨行菜及罌 粟花之 DREB/CBF 轉錄因子僅受低溫之影響,而辣椒、大豆、野胡蘿蔔等之 DREB/CBF 轉錄因子則同時受高溫及低溫之影響。與單子葉作物相比,全基因序 列總長、全基因序列 G/C 所佔比率及高度相似性片段 G/C 所佔的比率之範圍較雙 子葉植物差異大。在單子葉作物中高度相似性片段平均為 646.3 bp, 雙子葉植物高 度相似性片段平均為302 bp;單子葉作物高度相似性片段 G/C 所佔比率平均為67.3 %,雙子葉植物高度相似性片段 G/C 所佔比率平均為 51%;單子葉作物全基因總 長平均為1318.9 bp,雙子葉植物全基因總長平均1150 bp;單子葉作物全基因G/C 所佔比率平均為 62.1%, 雙子葉植物全基因佔 G/C 所佔比率平均為 45%, 在單子 葉作物中,全基因序列總長、全基因所佔 G/C 的比率、高度相似性片段總長及高

度相似性片段所佔 G/C 的比率之平均值較雙子葉植物高。

(4) COR15 基因

在雙子葉之阿拉伯芥、油菜、薺菜及亞麻薺,及單子葉之小麥的 COR15 基因 均受低溫之影響(表八、表九)。COR15 基因在單子葉作物及雙子葉植物中序列總長 介於 686 bp (CbCor15A) – 5641 bp (BnCor15B)之間,全基因序列 G/C 所佔比率介於 33.4% (BnCor15B) – 42% (CbCor15A)間,高度相似性片段總長介於 584 bp (CbCor15A) – 905 bp (BnCor15B),高度相似性片段 G/C 所佔的比率介於 33.3 % (BnCor15B) – 42% (CbCor15A)間(表八、表九)。在單子葉作物中高度相似性片段 總長平均為 875.0 bp,雙子葉植物高度相似性片段總長平均為 773.0 bp;單子葉作 物高度相似性片段 G/C 所佔比率平均為 37.3%,雙子葉植物高度相似性片段 G/C 所佔比率平均為 36.5%;單子葉作物全基因序列總長平均為 4549.0 bp,雙子葉植 物平均為 2271.5 bp;全基因 G/C 所佔的比率,單子葉作物平均值為 46.7%,雙子 葉植物為 37.5%,在單子葉作物中,高度相似性片段、全基因序列總長及全基因 序列 G/C 所佔比率皆較雙子葉植物高,但在高度相似性片段 G/C 所佔之比率,單 子葉作物及雙子葉植物平均值相近。

19

表六、DREB/CBF 轉錄因子在單子葉作物中高度相似性片段、全基因序列總長及其 G/C 所佔之比率

transcription factors DRED/CDF in monocotyfedons.					
基因	受高温或低温或	高度相似性序列		全基因序列	
	兩者之影響	總長(bp)	G/C 所佔比率(%)	總長(bp)	G/C 所佔比率(%)
LpCBF3	L	644	66.3	942	59.7
OsDREB1A	L	647	70.1	895	67.2
OsDREB1B	L	607	69.5	897	65.6
TaDREB2	L	647	67.7	1043	65.0
TaDREB3	H/L	651	70.6	1004	65.6
ZmDREB1A	H/L	662	69.8	1085	66.4
ZmDREB2A	H/L	666	56.8	3366	45.5
平均		646.3	67.3	1318.9	62.1
範圍		607 - 666	56.8 - 70.6	895 – 3366	45.5 - 67.2

Table 6. The length and G/C content of whole genomic and high similarity sequences of transcription factors DREB/CBF in monocotyledons.

註:Lp 為多年生黑麥草,Os 為水稻,Ta 為小麥,Zm 為玉米

表七、DREB/CBF 轉錄因子在雙子葉植物中高度相似性片段、全基因序列總長及 其 G/C 所佔之比率

	受高温或低温或	高度相似性序列		全基因序列	
基因	雨者之影響	總長(bp)	G/C 所佔比率(%)	總長(bp)	G/C 所佔比率(%)
AhERF4	L	296	53	1367	44
AhERF5	L	305	46	1820	40
AhERF6	L	314	51	1997	41
AtDREB1A	L	313	53	1391	42
CaCBF1A	H/L	301	47	885	42
DcDREB-A6	H/L	277	51	993	46
GmDREB1A-2	H/L	306	51	1095	48
GmDREB1B-1	H/L	291	56	814	55
GmDREB1C-1	H/L	314	49	2803	38
GmDREB1D-1	H/L	306	55	638	53
GmDREB1E-1	Н	293	49	567	46
GmDREB1F-1	H/L	295	48	690	44
GmDREB1G-1	Н	293	54	572	55
LIDREB1A	L	311	51	925	40
PnDREB1	L	309	48	699	42
平均		302	51	1150	45
範圍		277 - 314	45.9 - 55.7	567 - 2803	38.1 - 55.2

Table 7. The length and G/C content of whole genomic and high similarity sequences of transcription factors DREB/CBF in dicotyledons.

註:Ah 為落花生,At 為阿拉伯芥,Ca 為辣椒,Dc 為野胡蘿蔔,Gm 為大豆, Ll 為寬葉獨行菜,Pn 為罌粟花。 表八、COR15 基因在雙子葉植物中高度相似性片段、全基因序列總長及其 G/C 所 佔之比率

Table 8. The length and G/C content of whole genomic and high similarity sequences of gene *COR15* in dicotyledons.

基因	受高温或低温或	高度相似性序列		全基因序列	
	兩者之影響	總長(bp)	G/C 所佔比率(%)	總長(bp)	G/C 所佔比率(%)
AtCor15A	L	894	33.9	1890	35.4
BnCor15B	L	905	33.3	5641	33.4
CbCor15A	L	584	42.0	686	42.0
CsCor15A	L	709	36.7	869	39.3
平均		773.0	36.5	2271.5	37.5
範圍		584 - 905	33.3 - 42.0	686 - 5641	33.4 - 42.0

註:At 為阿拉伯芥,Bn 為油菜,Cb 為薺菜,Cs 為亞麻薺。

表九、COR15 基因在單子葉作物中高度相似性片段、全基因序列總長及其 G/C 所 佔之比率

Table 9. The length and G/C content of whole genomic sequence and high similarity sequences of gene *COR15* in monocotyledons.

基因	受高温或低温或	高度相似性序列		全基因序列	
	兩者之影響	總長(bp)	G/C 所佔比率(%)	總長(bp)	G/C 所佔比率(%)
Wcor15	L	875	37.3	4549	46.7

註:W為小麥。

2. 核苷酸保守序列組成

(1) HSF 轉錄因子

以多重序列比較分析 HSF 轉錄因子在單子葉作物、雙子葉植物及單雙子葉植物中核苷酸序列之保守片段組成,在單子葉作物中共有 766 bp 高度相似性片段, 在 5416 bp - 5468 bp (圖一 A)及 7701 bp - 7740 bp (圖一 B)之區間具有連續高 度相似性片段,相似性片段長各別是 53 bp 及 40 bp;在雙子葉植物共有 534 bp 高 度相似性片段,在 1417 bp - 1484 bp (圖一 C)及 5359 bp - 5421 bp (圖一 D)之 區間有連續高度相似性片段,高度相似性片段長各別為 68 bp 及 63 bp,在雙子葉 植物中有核苷酸序列插入使得雙子葉連續高度相似性片段較單子葉作物較長,在 番茄的 SIHSFA4A 轉錄因子之 1422 bp - 1436 bp 區間具有 15 bp 核苷酸序列插入, 及番茄的 SIHSFB-2a-like 轉錄因子中之 5363 bp - 5369 bp、5380 bp - 5390 bp、 5405-5409 bp 之區間有個別有 7bp、11bp、5bp 核苷酸序列插入,並與單子葉作物 高度相似性片段比較,兩處連續高度相似性片段在單子葉作物及雙子葉植物中具 極高的相似性 (圖一A與圖一C、圖一B與圖一D),這些高度相似性片段可用於 設計引子,以應用於分析各物種之 HSF 轉錄因子,總共可設計成兩對引子分別為 HSF-F1:5'-TTYAAGCACARYAAYTTC-3' 與 HSF-R1: 5'-CRAAYTCCCAYYTRTC-3'、HSF-F2:5'-CARCTCAACACCTAYGT -3'與 HSF-R2: 5'-AACCTTCCTRAATCCCR-3'。將單子葉與雙子葉植物 HSF 轉錄因子進行多重比 較分析 (附圖二),共有 466 bp 高度相似性片段,其中 168 bp 屬於單子葉植物特有 高度相似性片段、229 bp 為雙子葉植物特有高度相似性片段,61 bp 為單子葉及雙 子葉共同高度相似性,在 6610 bp - 6650 bp 之區間具 41 bp 連續高度相似性片段(圖 一 E),此連續性片段與單子葉 5416 bp - 5468 bp 之區間及雙子葉 1417 bp - 1484 bp 區間具有高度的相似性。

(2) WRKY 轉錄因子

針對 WRKY 轉錄因子進行多重比較分析單子葉作物、雙子葉植物及綜合單雙 子葉植物之核苷酸保守片段組成,在單子葉作物中共有 415 bp 高度相似性片段, 在 8867 bp - 8902 bp 之區間 (圖二 A)具連續高度相似性片段,片段總長 36 bp,其 中以 TA 及 T 為共同保守序列;雙子葉植物中共有 391 bp 高度相似性片段,在 5812 bp - 5833 bp 之區間具連續高度相似性片段 (圖二 B),片段總長 22 bp,其中以 A 及 T 為共同保守序列,與單子葉作物 8867 bp - 8902 bp 之區間相比,單子葉作物 所插入核苷酸序列較雙子葉植物長,插入序列在水稻的 OsWRKY62 轉錄因子 8871 bp - 8891 bp 之區間,具 11bp 序列插入;雙子葉植物中也具有核苷酸序列插入, 分別位於番茄的 SIWRKY53 5814bp - 5818 bp 之區間具 5 bp 的插入序列及 SIWRKY62 的 5814bp - 5818 bp、5820 - 5821 bp 之區間有 5 bp 及 2 bp 序列插入。 單子葉及雙子葉植物 4329 bp - 4346 bp 之區間 (圖二 C)與單子葉作物 8867 bp -

23

8902 bp 及雙子葉植物 5812 bp - 5833 bp 之區間相比,此三片段具高度相似性,因此可針對此區間設計引子作為分析各物種 WRKY 轉錄因子之應用,所設計正向引 子序列為 WRKY-F1:5'-TAYTAYCRGTRYAC-3'。

在單子葉作物 9052 bp - 9104 bp 之區間有連續高度相似性片段 (圖二 D),片 段總長 53bp,其中以A,G,GA 及 TA 為保守序列;雙子葉植物 5925 bp - 5997 bp 之區間具有連續高度相似性片段(圖二 E),片段總長共 74 bp,其中以A,T 及 TA 為保守序列,與單子葉作物 9052bp - 9104 bp 之區間相比,雙子葉植物連續高度相 似性片段有序列插入,在番茄的 SIWRKY26 及 SIWRKY62 的 5926 bp - 5945 bp 之 區間有 20 bp 序列插入,但與單子葉連續高度相似性片段相比仍具有一定程度的相 似性,針對單子葉雙子葉植物 4371 bp - 4421 bp 之區間比較之(圖二 F),此區間片 段總長共 51 bp,此片段與單子葉作物 9052 bp - 9104 bp 及雙子葉植物 5925 bp -5997 bp 之區間相比具有高度的相似性,在單子葉作物及雙子葉植物中此片段皆具 有高度相似性,因此可針對此片段設計引子以作為分析各物種 WRKY 轉錄因子之 工具,設計兩條反向引子為 WRKY-R1:5'-TAGGTGRYGAYGAGC-3'及 WRKY-R2:5'-GGRTCGTCCYRGYYYCGYT-3'。

(3) DREB/CBF 轉錄因子

DREB/CBF 轉錄因子進行多重序列比較分析單子葉、雙子葉作物及綜合單雙 子葉植物之核苷酸保守片段組成,在單子葉作物中共有 682 bp 高度相似性片段, 在 2411 bp - 2430 bp (圖三 A)之區間有連續高度相似性片段,總長共 20bp,其中以 T、G、CG、GG及GTG為保守序列,及 2453 bp - 2481 bp (圖三 B)之區間具連續 高度相似性片段,片段總長為 29 bp,其中以T、G、GG及TA為保守序列;雙子 葉作物中共有 314 bp 高度相似性片段,在 1082 bp - 1101bp 之區間(圖三 C)有連 續高度相似性片段,片段總長為 20 bp,其中以A、T、G、GA、CC及TGGG為 保守序列,及 1109 bp - 1137 bp 處(圖三 D)有連續高度相似性片段,片段總長為 28 bp,其中以T、G、GA、CC及TGGG為保守序列,與單子葉作物相比,兩片段之 連續高度相似相片段長度接近,片段間具有高度的相似性(圖三 A 與圖三 C、圖 三B與圖三D比較)。綜合單子葉與雙子葉植物之DREB/CBF 轉錄因子進行多重 序列分析, 共 486 bp 高度相似性片段, 84 bp 屬於單子葉植物高度相似性片段, 11 bp 為雙子葉植物高度相似性片段, 383 bp 為單子葉及雙子葉植物共同高度相似性 片段, 並在 2543 bp – 2562 bp(圖三 E)、2585 bp – 2631 bp 之區間 (圖三 F)具有兩 處連續高度相似性片段,兩處連續高度相似性片段各為20bp及29bp長,且在2543 bp - 2562 bp 之區間的 2559 bp 處,可清楚辨別單子葉及雙子葉植物差異,此處單 子葉植物核苷酸序列多為 G,雙子葉植物中核苷酸序列多為 A,且兩段連續性片 段在單子葉及雙子葉植物中具高度的相似性,顯示 CBF/DREB 轉錄因子在單子葉 植物及雙子葉植物中具高度相似性,並可針對兩區間之高度相似性片段設計引子, 作為篩選物種間 CBF/DREB 轉錄因子之工具,所設計之一條正向及兩條反向引子 CBF/DREB-F1:5'-TAYCGYGGCGTGCGG-3' 序 列 如 下 : 及 CBF/DREB-R1:5'-CGCACCTCGCACACCCAY-3' 與 CBF/DREB-R2:5'-TCACACACCCACYTGCC-3' •

(4) COR15 基因

針對 COR15 基因在單子葉及雙子葉植物中進行多重序列比較分析,分析核苷酸保守片段組成,共有 908 bp 高度相似性片段,在 404 bp - 444 bp 之區間(圖四 A)具連續高度相似性片段,片段總長為 41 bp,其中A、T、G、CA、TT、CTG、GTC 及 ATGGCG 為共同保守序列,及在 1497 bp - 1532 bp 之區間(圖四 B)有連續高度相似性片段,片段總長為 35 bp,其中以 A、T、C、G、GG、AG、AAA 及 AGAAAGC 為共同保守序列,此二片段在單子葉及雙子葉作物具高度的相似性,顯示 COR15 基因序列在物種間具有一定程度的相似性,因此可針對此二片段設計 引子,作為篩選物種間 COR15 基因之應用工具,設計兩組引子序列如下:COR15-F1: 5'-ATGGCGATGTCTTTCTCA-3'與 COR15-R1:5'-GYAGTCYTYYGCTTTCT-3'及
COR15-F2:5'-GGRRCTGTTCYCACTG-3'

5'-TTYTCAACAAYGYAGTC-3' •

與



# (A) HSF 單子葉 5416 bp - 5468 bp 之區間

HSF-F1 primer

OsHSFA2A OsHSFA2C OsHSFA2D OsHSFC2A OsHSFC2A ZmHSF10 ZmHSF12 ZmHSF13 ZmHSF14 ZmHSF2 ZmHSF24 ZmHSF4 ZmHSF4 ZmHSF5 ZmHSF7 ZmHSF8 ZmHSF9	5416 T T T T T T T T T T T T T T T T T	5417 T T T T T T T T T T T T T	5418 C C C C C C C C C C C C C C C C C C C	5419 A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	5420 A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	5421 G G G G G G G G G G G G G G G G G G G	5422 C C C C C C C C C C C C C C C C C C	5423 A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	5424 C C C C C C C C C C C C C C C C C C	5425 A A A A A A G A A A A A A A A A A A A	5426 G A A G C A A A A A A A A A A A A A A A	5427 C C C C C C C C C C C C C C C C C C C	5428 A A A A A A A A A A A A A A A A C	5429 A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	5430 C C C C C C C C C C C C C C C C C C C	5431 T T T T T T T T T T T T T T T	5432 T T T T T T T T T T T T T T T T	5433 C C C C C C C C C C C C C C C C C C	5434 T T T T T T T T T T T T T T T A	5435 C C C C C C C C C C C C C C C C C C C	5436 C C C C C C C C C C C C C C C C C C C	5437 A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	5438 G G C G G G G G G G G G G G G G G G G	5439 C C C C C C C C C C C C C C C C C C C	5440 T T T T T T T T T T T T T T T	5441 T T T T T T T T T T T T T T T T T T	5442 C C C C C C C C C C C C C C C C C C	
OsHSFA2A OsHSFA2C OsHSFA2D OsHSFB2A OsHSFC2B ZmHSF10 ZmHSF12 ZmHSF13 ZmHSF14 ZmHSF2 ZmHSF24 ZmHSF4 ZmHSF4 ZmHSF4 ZmHSF8 ZmHSF8 ZmHSF9	5443 G G G G G G G G G G G G G G G G G G	F 5444 T T T T T T T T T T T T T T T T T	5445 C C C C C C C C C C C C C C C C C C	5446 C C C C C C C C C C C C C C C C C C	K 5447 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6	5448 C C C C C C C C C C C C C C C C C C	5449 C C C C C C C C C C C C C C C C C C	H 5450 A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	5451 G G G G G G G G G G G G G G G G G G G	5452 C C C C C C C C C C C C C C C C C C C	N 5453 T T T T T T T T T T T T T	5454 C C C C C C C C C C C C C C C C C C	5455 A A A A A A A A A A A A A A A A A A	N 5456 A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	5457 C C C C C C C C C C C C C C C C C C C	5458 A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	F 5459 C C C C C C C C C C C C C C C C C C C	5460 C C C C C C C C C C C C C C C C C C C	5461 T T T T T T T T T T T T T T T T	F 5462 A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	5463 C C C C C C C C C C C C C C C C C C C	5464 G G G G G G G G G G G G G G G G G G G	S 5465 T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	5466 A G G A C A C A C G G G G G G G G G G	5467 A A C C C A A C C A A A C C A A A A A	F 5468 G G G G G G G G G G G G G G G G G G G		

27 HSF-F2 primer

(B) HSF 單子葉 7701 bp - 7740 bp 之區間



HSF-R2 primer

HSF-R1 primer



# (C) HSF 雙子葉 1417 bp - 1484 bp

之區間

703083

																																																潜	- 					
		ſ	D)	Н	SI	F.	雔	子	笹	52	350	) h	n _	- 54	421	hn	· >	區	問																												NY.			X				
		(	<i>D</i> )	11		L	x	1	朩	5.		/ 0	Р	5	121	υp	~	-	1=1																												at -	0	0	E				
	535	9 53	60 53	61 5	362	5363	5364	5365	5366	5367	5368	5369	5370 5	371	5372 53	73 537	4 537	5 5376	5377	5378	5379 5	380 53	81 538	2 538	3 538	1 538	5 538	5 538	7 5388	3 5389	5390	5391	5392 5	393 5394	1 5395	5396	5397 5	5398 5399 5	5400	5401 540	)2 5403	5404	5405 5	406 54	07 5408	5409 5	5410 5411	5412 5413	5414 5	415 5416 5	5417 54	18 5419 5	5420 54	421
AtHsfA1a	С	A	G	(	3	-	-	-	-	-	-	-	G 1	ſ	ТТ	Т	A	G	G	A	Α -	-	-		-	-	-	-	-	-	-	A	G I	G	G	A 1	T (	C C A	A	G A	Т	С		-	-	- (	G A	T G	G C	A	A T	Т	T G	;
AtHsfA1b	C	A	G	(	3	-	-	-	-	-	-		G 1	[	Т Т т т	С	A	G	A	A .	A -	-	-	-	-	-	-	-	-	•	•	A	G I	T	G	A 1	T		Г	G A	С	С		-	-	- (	G A	T G	G		L T	T	T G	Į
AtHSIA10 AtHsfA1e	C	A	G		ı F	-		2	2		2		G.	r r	і і ТТ	C T	A	G	G A	A . A	A - A -					2		-				A	GI GI	. I Т	G	A			A A	G A	I C	A C			-	- (		IG TG	G		s i	T 1	T G	ļ
AtHSFA2	C	A	G	Ó	3	-	-	-	-	-	-		G	A	тт	C	A	G	A	A	Α-				-			-				G	A I	T	G	A 1	T C	C C	A	G A	Т	A			-	- (	G A	T G	G	A	A T	T	T G	j
AtHsfB1	Т	А	G	(	3	-	-	-	-	-	-		G A	A	ТТ	Т	С	G	Т	A .	A -			-	-	-	-	-	-	-		А	A (	T	G	T A	A C	C C C	G	G A	Т	А		-	-	- 4	A A	T G	G C	A A	Δ T	T	T G	ļ
AtHsfB2a BrHsf.01	С	A	G	(	Ĵ	-	-	-		-			G	A I	ТТ тт	C	A	A	A	Α.	Α - Δ						-	-			:	A	G I		G	ТИ	A C		G	G A	T	C A	: :		-	- (	G A G	TG TG	G		ј Т с т	T	T T	
BrHsf-10						-			-	-			G	A	тт	С	A	G	A	A	A -							-				G	A I	C	G	A 1	T		G	G A	C	A				- (	G A	T G	G	A	G T	T (	C G	j
BrHsf-11	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-		G (	3	т т	Т	С	G	А	A .	Α -	-		-		-	-	-	-			A	T 1	G	G	T I	T (	c <mark>c</mark> c	С	G A	Т	С			-	- (	G T	T G	G G	A	J T	Т	с т	
BrHsf-15	•	-	-	-		-	-	-	-	-	-	•	G 1	ſ	Т Т т т	Т	A	G	A	Α.	A -	-	-	•	-	-	-	-		•	•	G	A I	A	G	A A	A (	G C A	A I	G A	G	A		-	-	- (	G A	T G	G		j T	T	T G	Į
BrHsf-20		-	-	-		-	-	2	2		2		G I	r r	іі ТТ	I C	A	G	A	A . A	A - A -					2		-		2	2	A	A I G T	A G	A	A	G C		A G	G A	G T	A C			-	- (	J A G	IG TG	G		J I G T	T T	T G	1
BrHsf-23		-	-	-		-	-	-	-	-			G (	3	т т	Т	A	G	G	A	Α -		-		-	-	-	-				A	G 1	G	G	A 1	T C	C C	A (	G A	C	C		-	-	. (	G G	T G	G	A	J T	T	T G	j
BrHsf-24		-	-	-		-	-	-	-	-	-		G 1	ſ	T T	Т	А	G	G	A	A -	-		-	-	-	-	-	-			A	G 1	Т	G	A 1	T (	G C A	A (	G A	Т	С		-	-	- (	G T	T G	C G	A	) T	T	T G	ţ
BrHsf-25 BrHsf-20	•	-	-	-		-	-	-	-	-	-		GI		ТТ тт	C	A	G	A	A .	A -		•	-	-	-	-	-	-	•	•	G	A 1 G 1	T T	G	T I	T C		A T	G A	С	A		-	-	- 0	G A	TG TG	G		j I	T ( T	C G	ļ
BrHsf-35		-				-	-						G (	3	г г Т Т	Т	c	G	A	A	A -											A	GI	A	G	T	T		G	G A	Т	C		-	-	. (	J T	T G	G		і і З Т	T	T T	1
GmHSF04	С	А	G	(	3	-	-	-	-	-			G 1	ſ	т т	Т	А	G	А	A	A -		-		-		-	-				G	G 1	Т	G	A O	c c	C C A	A	G A	Т	С		-	-	- (	G A	T G	G G	A A	A T	T 1	T G	i
GmHSF08	C	A	G	(	Ĵ	-	-	-	-	-	-		G 1	Γ	ТТ	Т	A	G	A	A .	A -	-	-	-	-	-	-	-	-	•	•	A	A I	T	G	A 1	T (	C C 1	Г	G A	C	A		-	-	- /	A G	T G	G	A	ј Т	T 1	T G	ł
GmHSF09 GmHSF10	C	A	G		j z	-	-		-	-			G	A r	ГТ тт	T C	C	G	A G	Α . Δ	Α - Δ	-						-				A A	A I A T	A T	G	A	T C		A G	G A	G T	С	: :	-		- (	j A	IG TG	G			T I	r G T G	ļ
GmHSF11	c	A	G	Č	3	-	-			-			G	A	г г Т Т	T	A	G	A	A	A -							-				A	G I	T	G	A (	C C		A	G A	A	C			-	- A	A A	T G	G	A	Á T	T	T G	j
GmHSF16	Т	А	G	(	3	-	-	-	-	-	-		G 1	r 1	т т	С	А	G	А	A .	A -	-		-	-	-	-	-	-			G	G 1	G	G	A 1	T (	c <mark>c</mark> c	G	G A	Т	С		-	-	- (	G G	T G	G	A A	A T	T (	C G	į
GmHSF17	С	A	G	0	Ĵ	-	-	-	-	-	-		G 1	ſ	ТТ	С	A	G	G	A .	A -	-	•	-	-	-	-	-	-	•	•	G	G 1	T	G	A 1	T C	C C A	A I	G A	Т	С		-	-	- (	G C	T G	G		i T	T	T G	Į
GmHSF25 GmHSF33	C	A	G		ı F	-		2	2		2		G	A .	і і ТТ	I T	A	G	A G	A . A	A - A -					2		-				A G	A I G T	A	G	A	G C		A A	G A	С Т	A C			-		A A	IG TG	G		A T	T T	T G	ļ
GmHSF34	C	A	G	Ó	3	-	-	-	-	-			G (	3	т т	Т	A	G	G	A	Α -		-		-	-	-	-				A	G 1	T	G	A 1	T C		Г	G A	Т	A		-	-	- 7	A A	T G	G	A	Á T	T	T G	j
SIHSF24	С	А	G	(	3	-	-	-	-	-	-		G 1	Г I	T T	Т	С	G	А	A	A -	-		-	-	-	-	-	-			G	A T	T	G	T (	G (	C C 1	Г	G A	С	А		-	-	- 4	A A	T G	G G	A A	A T	Т	C G	ţ
SIHsf30 SIHefA 10	C	A	G	0	3	-	-	-	-	-	-	•	G	4 r	ТТ тт	Т	A	G	A	A.	A -		-	-	-	-	-	-	-	-	•	G	G I C I	G	G	A	T (		Г	G A	C	A		-	-	- (	G A	TG TC	GG			T	T G	ļ
SILISIA IA SIHSFA3	C	A	G		J		-	2	2		2		G	4	гі ТТ	T	C	G	C	A	A -											A	A T	, <u>1</u> , C	G	A	T (	G C 1	л Г	G A	c	A				. (	G G	TG	G		н і 3 Т	T	T G	-
SIHSFA4A	C	А	G	(	3	-	-	-	-	-	-		G A	A	т т	С	A	А	G	A	Α -	-			-			-	-			A	A T	A	G	A 1	T (	C C C	С	G A	A	С		-	-	- 7	A A	T G	G	A	A T	T	C G	j
SIHsfA6B	Т	А	G	0	3	-	-	-	-	-	•	-	G A	A	ТТ	Т	А	G	G	A .	A -	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	G I	T	A	A 1	T (	C C A	A	G A	С	С		-	-	- A	A T	T G	G G	A	j T	T	T G	ł
SIHSIB-2a-like SIHsfB4	С	A	ſ		j	Т.	Т -	Т	G	A .	C .	C	A A	A I	ТТ ТТ	T C	A	G	A	A . A	A A	. A	A .	A	с.	Т.	Т	A -	A	A	Т -	A A	A A	T C	G	A T	т 1 А С		A G	T A G A	Т Т	T C	C A	ιT	Т	G /	A T	TG TG	A A G C			T I	r G	
StHSF30	C	A	G	0	3	-			-	-	-		G	Å	ТТ	T	A	G	A	A	A .							-				G	G I	G	G	A	T C	c c i	r	G A	C	A		-	-	- (	G A	T G	G	A	Á T	T	T G	j
StHSFA3	С	А	G	(	3	-	-	-	-	-	-		G	A I	T T	Т	С	G	С	A	A -		-	-	-	-	-	-	-			A	A T	C	G	A 1	T (	G C 1	Г	G A	С	А		-	-	- (	G G	T G	G C	A	3 T	T	T G	į
StHSFA5	C	A	G	(	3	-	-	-	-	-	-	-	G (		T T	С	С	G	G	A	A	-	-	-	-	-	-	•	-	-	•	G	A 1	T	G	A 1	T (	C C A	A	G A	А	A	• •		-	- (	G A	T G	G	i A	ι Τ	Т	T G	1
		Q											G		F			R			K												V	V		D		Р		D/	Е	-						W		Е		F		

(E	) HSF	單雙子葉	6610 bp –	6650 bp 之區	間							大潜	A A A A A A A A A A A A A A A A A A A
AtHsfA1a AtHsfA1b AtHsfA1d AtHsfA1e AtHsfB2a BrHsf-01 BrHsf-10 BrHsf-11 BrHsf-15 BrHsf-16 BrHsf-20 BrHsf-20 BrHsf-24	6610         6611           C         A           C         A           C         A           C         A           C         A           C         A           C         A           C         A           G         A           G         C           -         A           -         A           G         C           -         A           C         T	$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	6615         6616         6617           T         T         T           T         T         T           T         T         T           T         T         T           T         T         T           T         G         G           T         G         G           T         T         T           T         G         A           T         T         T           T         T         T           T         T         T           T         T         T           G         G         A           T         T         T           T         T         T           G         T         T           G         T         T           G         T         T	6618         6619         6620         662           T         A         G         G           C         A         G         A           C         A         G         G           T         A         G         A           C         A         G         A           G         G         A         G           A         G         G         A           G         G         A         G           A         G         G         A           G         G         A         G           A         G         G         A           G         G         A         A           G         G         A         A           C         A         G         A           T         A         G         A           T         A         G         A           T         A         G         A           T         A         G         A           T         A         G         A           T         G         G         A	$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	$ \begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	6631         6632         6633         663           C         C         -         A           C         C         -         T           C         C         -         A           C         C         -         A           C         C         -         A           C         C         -         A           T         G         -         A           T         G         -         A           T         C         -         A           T         C         -         A           G         C         -         A           G         C         -         A           G         C         -         A           G         C         -         A           C         C         -         A           C         C         -         A           C         C         -         A           C         C         -         A           C         C         -         A	34         6635         6636         6637           G         A         T           G         A         C           G         A         C           G         A         C           G         A         C           G         A         C           G         A         C           G         A         C           G         C         T           G         C         T           G         A         C           G         A         C           G         A         C           G         A         C           G         A         C           G         A         G           G         A         C           G         A         C           G         A         C           G         A         C           G         A         C           G         A         C	$ \begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	$ \begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$
BrHsr-25 BrHsr-25 BrHsr-25 GmHSF04 GmHSF04 GmHSF04 GmHSF10 GmHSF10 GmHSF10 GmHSF17 GmHSF17 GmHSF33 GmHSF34 SHBSF24	C G T A A A C A C A T T G C A T T G C A A C A A C A A C A A C A A C A A C A C	$ \begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	A     C     I       T     A     A       T     T     T       T     G     A       T     T     T       T     T     T       T     C     C       A     T     T       T     T     T       T     T     T       T     T     T       T     T     T       T     G     A       T     G     A       T     G     A       T     G     A	C     C     G     A       C     C     G     G       C     C     G     G       T     A     G     A       T     A     G     A       T     A     G     A       T     A     G     A       C     A     G     A       T     A     G     A       C     A     G     A       C     A     G     A       T     A     G     G       T     A     G     G       T     A     G     G       T     A     G     G       T     A     G     G       T     A     G     G       T     A     G     G       T     A     G     G	$ \begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	$ \begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	$ \begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	$ \begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	$ \begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	$ \begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$		$ \begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	$ \begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$
SIH5430 SIH5FA3 SIH5FA3 SIH5FA3 SIH5FA4A SIH5FA2a-like SIH5F30 SIH5FA3 SIH5FA3 SIH5FA3 SIH5FA3 OsH5FA2C OsH5FA2C OsH5FA2D	C A C A C A C A T A A T G G C A T G C A T G C A T G C A	$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	A         T         T           T         T         T           A         T         T           A         T         T           A         T         T           A         T         T           A         T         T           A         T         T           C         G         T           C         C         A           G         T         T           T         T         T	T       A       G       A         T       A       G       A         T       C       G       C         C       A       A       G         T       A       G       G         T       G       G       T         C       G       G       A         T       C       G       G         C       G       G       T         C       G       G       T         C       G       G       T         C       G       G       T         C       G       G       G         T       T       G       G	A         A         G           A         A         G           A         A         G           A         A         A           A         A         A           C         T         T           G         G         A           A         A         G           A         A         G           A         A         G           A         A         G           A         A         G           A         A         G           A         A         G           A         A         G           A         A         G           A         A         G           A         A         G           A         A         G           A         A         G           A         A         G           T         G         C	$ \begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	$ \begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	$ \begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	$ \begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	$ \begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$
OsHSFB2A OsHSFC2A OsHSFC2B ZmHSF10 ZmHSF13 ZmHSF13 ZmHSF14 ZmHSF20 ZmHSF20 ZmHSF24 ZmHSF6 ZmHSF6 ZmHSF7 ZmHSF8	C A C A C A T A T A T A T A T A T A C	$ \begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$		C         A         A         G           T         C         G         C           C         C         G         C           T         A         G         G           T         A         T         C           -         -         G         A           T         A         A         T           C         A         A         G           C         A         A         G           C         A         G         G           C         A         G         G           C         A         G         G           C         A         G         G           C         A         G         G           C         A         G         G           C         A         G         G           C         A         G         G           C         A         G         G           C         A         G         G           C         A         G         G           C         A         G         G           C         A	A       A       G         A       A       G         A       A       G         A       A       G         A       A       G         C       T       G         A       A       A         A       A       A         A       A       A         A       A       G     <	$ \begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	$ \begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	$ \begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$		$ \begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	$ \begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$
	Q	G	<u> </u>	S / R	K	<u>v</u>	D	P	D / E	R	W	E	F E

圖一、HSF 轉錄因子在單子葉及雙子葉植物中核苷酸保守片段

Figure 1. The consvered regions on HSF transcription factor of monocotyledons and dicotyledons.

- (A) HSF 轉錄因子在單子葉作物中核苷酸高度相似性片段(5416 bp 5468 bp 之區間),黑色填色為單子葉作物保守片段,灰色填色為單子葉作物高度相似性片段,黑色箭頭為引子設計位置。
- (B) HSF 轉錄因子在單子葉作物中核苷酸高度相似性片段(7701 bp 7740 bp 之區間),黑色填色為單子葉作物保守片段,灰色填色為單子葉作物高度相似性片段,黑色箭頭為引子設計位置。
- (C) HSF 轉錄因子在雙子葉植物中核苷酸高度相似性片段(1417 bp 1484 bp 之區間),黑色填色為雙子葉植物保守片段,灰色填色為雙子葉植物高度相似性片段。
- (D) HSF 轉錄因子在雙子葉植物中核苷酸高度相似性片段(5359 bp 5421 bp 之區間),黑色填色為雙子葉作物保守片段,灰色填色為雙子葉植物高度相似性片段。
- (E) HSF 轉錄因子在單子葉及雙子葉植物中核苷酸高度相似性片段(6610 bp 6650 bp 之區間),藍色填色為單子葉植物高度相似性片段, 綠色填色為雙子葉植物高度相似性片段,灰色填色為單子葉及雙子葉作物高度相似性片段,紅色方框為單子葉及雙子葉植物具差異 之高度相似性序列處。

(A) WRKY 單子葉 8867bp-8902 bp 之區間 WRKY-F1 primer

	8867	8868	8869	8870	8871	8872	8873	8874	8875	8876	8877	8878	8879	8880	8881	8882	8883	8884	8885	8886	8887	8888	8889	8890	8891	8892	8893	8894	8895	8896	8897	8898	8899	8900	8901	8902
TaWRKY53	С	Т	А	С	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Т	А	С	Α	А	G	Т	G	С	А	G
TaWRKY52	С	Т	А	С	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Т	Α	С	С	G	Т	Т	G	С	Т	C
TaWRKY51	С	Т	А	С		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Т	Α	С	С	G	G	Т	G	С	T	С
TaWRKY50	С	Т	А	С		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Т	Т	С	С	G	G	Т	G	С	А	С
TaWRKY48	С	Т	А	С	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Т	Т	С	С	G	G	Т	G	С	Т	С
TaWRKY46	С	Т	А	С		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Т	A	С	С	G	G	Т	G	С	А	С
TaWRKY44	Т	Т	А	С	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Т	A	С	А	А	А	Т	G	С	А	С
TaWRKY33	С	Т	А	С	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Т	Т	С	С	G	G	Т	G	С	Т	С
TaWRKY10	С	Т	А	С	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Т	A	С	С	G	G	Т	G	С	Т	С
OsWRKY79	С	Т	А	С	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Т	А	С	А	G	G	Т	G	С	А	С
OsWRKY74	Т	Т	А	С	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Т	A	С	С	G	Т	Т	G	С	А	С
OsWRKY68	С	Т	А	С	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Т	А	С	А	А	G	Т	G	С	А	G
OsWRKY66	G	Т	А	С	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Т	A	С	Α	G	А	Т	G	С	А	G
OsWRKY62	А	Т	А	С	Α	Т	Т	Т	Т	Т	С	С	С	С	А	Т	С	С	А	Т	С	G	А	G	Т	Т	Т	Т	Т	А	Т	Т	А	Т	А	А
OsWRKY51	А	Т	А	С	- I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Т	А	С	А	А	G	Т	G	Т	А	G
OsWRKY45	С	Т	А	С	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Т	Т	С	С	G	G	Т	G	С	А	С
OsWRKY39	G	Т	А	С	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Т	А	С	С	G	G	Т	G	С	А	G
OsWRKY102	С	Т	А	Т	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Т	А	С	С	G	G	Т	G	С	А	С
			Y		-																						Y			R			С		I.	

#### (B) WRKY 雙子葉 5812bp-5833 bp 之區間



1. 18 X X



(C) WRKY 單雙子葉 4329 bp-4346 bp 之區間

a	4329	4330	4331	4332	4333	4334	4335	4336	4337	4338	4339	4340	4341	4342	4343	4344	4345	4346
CaWRKY1	C	Т	C	C	Т	A	G	C	C	A	C	A	C	G	-	-	-	G
CSWRKY18	А	Т	A	T	Т	А	1	A	G	А	Т	G	Т	A	G	С	А	G
CsWRKY21	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-		-	-	-
CsWRKY23	С	Т	A	С	Т	A	С	A	A	Α	Т	G	С	A	-	-	-	C
CsWRKY25	G	T	А	Т	T	А	Т	А	Α	G	T	G	Т	A	G	С	А	C
CsWRKY33	Α	Т	А	Т	Т	А	С	А	Α	А	Т	G	Т	А	G	С	А	G
CsWRKY4	С	Т	А	С	Т	А	С	С	G	А	Т	G	Т	А	-	-	-	С
CsWRKY46	С	Т	А	Т	Т	А	С	А	G	А	Т	G	С	А	-	-	-	С
GmWRKY21	С	Т	А	С	Т	А	С	А	Α	G	Т	G	Т	Т	-	-	-	С
SIWRKY2	А	Т	Т	С	Т	А	G	G	С	Т	А	Т	Т	G	-	-	-	С
SIWRKY26	G	А	Т	_T	Т	С	А	Т	C	Т	G	A	G	G	-	-	-	C
SIWRKY27	А	G	А	Т	Т	G	А	А	С	Т	А	G	Т	А	-	-	-	G
SIWRKY33	А	С	А	G	Т	А	С	А	G	А	G	G	С	А	G	-	-	С
SIWRKY52	Т	Т	А	Т	Т	А	С	А	А	G	Т	G	С	А	-	-	-	С
SIWRKY53	Т	Т	А	Т	Т	Т	Т	Т	Т	Т	С	С	С	А	-	-	-	Α
SIWRKY56	С	Т	А	Т	Т	А	С	А	Α	А	Т	G	Т	А	-	-	-	С
SIWRKY60	А	А	G	Т	Т	-	А	С	Т	G	А	G	Т	G	-	-	-	С
SIWRKY62	Т	Т	Т	G	Т	С	А	А	Α	Т	G	G	Т	А	-	-	-	Т
TaWRKY53	С	Т	А	С	Т	А	С	А	Α	G	Т	G	С	А	G	С	А	С
TaWRKY52	С	Т	А	С	Т	А	С	С	G	Т	Т	G	С	Т	С	-	-	-
TaWRKY51	С	Т	А	С	Т	А	С	С	G	G	Т	G	С	Т	С	-	-	-
TaWRKY50	С	С	G	G	Т	G	С	А	С	С	С	А	С	С	G	G	С	А
TaWRKY48	С	Т	А	С	Т	Т	С	С	G	G	Т	G	С	Т	С	G	Т	Т
TaWRKY46	С	Т	А	С	Т	А	С	С	G	G	Т	G	С	А	С	G	G	С
TaWRKY44	Т	Т	А	С	Т	А	С	А	Α	А	Т	G	С	А	-	-	-	С
TaWRKY33	С	Т	А	С	Т	Т	С	С	G	G	Т	G	С	Т	С	С	Т	Т
TaWRKY10	С	Т	А	С	Т	А	С	С	G	G	Т	G	С	Т	С	-	-	-
OsWRKY79	С	А	G	G	Т	G	С	А	С	G	С	А	С	А	Α	G	С	Т
OsWRKY74	С	С	G	Т	Т	G	С	А	С	С	С	А	С	С	G	С	С	А
OsWRKY68	С	Т	А	С	Т	А	С	А	Α	G	Т	G	С	А	G	С	А	С
OsWRKY66	G	Т	А	С	Т	А	С	А	G	А	Т	G	С	А	G	С	Α	G
OsWRKY62	С	G	А	G	Т	А	А	Т	С	Т	Т	А	С	Т	A	Т	G	-
OsWRKY51	А	Т	А	С	Т	А	С	А	Α	G	Т	G	Т	А	G	С	Α	С
OsWRKY45	С	С	G	G	Т	G	С	А	С	G	С	А	С	А	Α	G	Т	А
OsWRKY39	G	Т	А	С	Т	А	С	С	G	G	Т	G	С	А	G	Т	А	G
OsWRKY102	А	Т	Т	A	Т	Т	С	А	Т	G	Ā	T	T	А	-	-	-	А
			Y			Y		•				С		-				



9085 9086 9087 9088 9089 9090 G T G A C T

9091 9092

9082 9083 9084 G T G

9076 9077 9078

9079 9080 9081



WRKY-R2 primer

	7052	,055	7054	7055	7050	1057	7050	<i>J</i> 0 <i>JJ</i>	2000	2001	7002	7005	7004	7005	7000	2007	2000	,000	2010	2071	2012	2015	7074	2015	2070	2011	2070	,01)	2000	2001	2002	7005	7004	7005	1000	1001	7000	1001	1010	1011	1012
TaWRKY53	G	А	G	С	G	С	G	С	С	С	Т	G	G	А	С	G	А	С	С	С	G	G	С	G	А	Т	G	С	Т	G	G	Т	G	G	Т	G	А	С	T	Т	А
TaWRKY52	G	А	G	С	G	G	G	А	Т	С	G	С	G	А	Т	G	А	С	G	А	G	C	G	С	Т	Т	С	G	Т	С	А	Т	С	А	С	С	А	С	С	Т	А
TaWRKY51	G	А	G	С	G	G	G	А	С	C	G	G	G	А	С	G	А	С	С	С	G	G	С	G	Т	А	С	G	Т	G	G	Т	G	А	С	С	А	С	G	Т	А
TaWRKY50	С	А	G	С	G	Т	G	С	Т	С	А	С	G	G	С	G	А	С	С	С	G	C	Т	G	С	Т	С	Т	Т	С	G	А	С	G	Т	С	G	Т	G	Т	А
TaWRKY48	С	А	G	С	G	С	А	G	С	G	С	С	G	А	G	G	А	С	A	А	G	Α	С	С	G	Т	G	С	Т	Т	G	Т	С	G	С	С	Α	С	G	Т	А
TaWRKY46	G	А	G	С	G	G	Т	С	G	С	А	G	C	A	G	G	А	С	С	С	Т	Т	С	С	А	Т	G	G	Т	Т	G	Т	С	А	С	С	Α	С	С	Т	А
TaWRKY44	G	А	А	А	G	А	Т	G	Т	Т	С	G	C	А	А	G	А	С	С	С	А	А	С	G	G	С	G	G	Т	G	А	Т	А	А	С	Т	А	С	А	Т	А
TaWRKY33	С	А	G	A	G	G	А	G	С	G	С	С	G	А	G	G	А	С	A	А	G	Α	С	С	А	Т	Α	C	Т	С	G	Т	G	G	С	G	А	С	G	Т	А
TaWRKY10	G	А	G	С	G	G	G	Α	С	C	G	С	G	А	С	G	А	С	С	С	G	С	Т	C	Т	А	C	G	Т	С	C	Т	С	А	С	С	А	С	С	Т	А
OsWRKY79	С	А	G	С	G	С	Т	G	С	G	А	G	G	С	С	G	А	С	С	С	G	Т	С	G	А	А	Т	Т	A	С	G	А	С	А	Т	С	А	С	С	Т	А
OsWRKY74	С	А	G	С	G	С	А	С	С	G	А	С	G	А	G	G	А	С	G	С	G	Α	С	G	G	Т	G	Т	Т	С	G	А	С	G	Т	G	А	Т	С	Т	А
OsWRKY68	G	А	G	С	G	С	G	С	С	Α	С	С	G	А	С	G	А	С	С	С	G	G	С	G	А	Т	G	C	Т	G	G	Т	С	G	Т	G	А	С	С	Т	А
OsWRKY66	G	А	G	С	G	С	А	G	С	C	G	G	A	С	С	G	А	С	С	С	С	A	A	C	А	Т	G	C	Т	С	G	Т	С	А	Т	С	А	С	С	Т	А
OsWRKY62	С	А	A	А	G	А	Т	G	Т	G	С	G	G	А	G	G	А	Т	А	G	G	Т	С	А	А	Т	G	C	Т	А	G	Т	G	G	С	G	Α	С	С	Т	А
OsWRKY51	G	А	G	С	G	С	G	Α	С	C	С	G	A	С	С	G	А	С	С	С	G	Т	С	С	А	Т	G	C	Т	С	А	Т	С	G	Т	С	А	С	С	Т	А
OsWRKY45	С	А	G	С	G	С	Т	G	С	G	А	С	G	А	С	G	А	С	С	С	G	G	С	G	А	G	С	Т	A	С	А	G	G	G	Т	С	А	С	С	Т	А
OsWRKY39	G	А	G	A	G	G	А	G	С	C	G	С	Т	С	С	G	А	С	С	С	С	A	A	C	А	С	С	Т	Т	С	А	Т	С	C	Т	С	А	С	С	Т	А
OsWRKY102	G	А	G	С	G	G	С	Т	G	G	С	G	G	А	G	G	А	С	С	С	С	С	G	С	А	Т	G	G	Т	G	A	Т	С	А	С	С	Α	С	С	Т	А
													_																		-										
		K			R									D			D			Р		-				М		-				V		-			-	Т			

#### (E) WRKY 雙子葉 5925 bp - 5985 bp 之區間

(D) WRKY 單子葉 9052 bp - 9092 bp 之區間

9052 9053 9054

	5925	5926	5927 5	5928 5	929 59	930 593	1 5932	5933	5934	5935 5	936 59.	37 593	8 5939	9 5940	5941	5942	5943	5944 59	45 59	46 5947	5948	5949	5950	5951	5952 5	6953 59	54 595	55 5956	5 5957	5958 5959	5960 5	961 59	62 596	63 5964	5965	5966 59	967 596	8 5969 5	970 5971	5972	5973 5974	5975 597	6 5977	5978 59	979 5980	5981 5	982 5983	5984 5985
CaWRKY1	С	-			-	-	-		-		-	-	-	-	-	-	-		A	G	A	G	A	A	G (	C A	Т	А	G	A A	G	A T	С	A	G	T C	Т	A '	Т	G	T G	G	G	G C	A	A C	C A	T A
CsWRKY18	G				-	-			-		-	-	-	-	-	-	-		A	G	А	G	G	A	A (	C A	G	А	Т	C C	G	A C	C	С	G	G G	A	A '	G	T	ТС	A T	А	G T	C	A C	СТ	Т А
CsWRKY21	С								-			-	-	-		-	-		A	A	A	G	A	A	G 1	ГG	Т	Т	G	A A	G	A T	С	А	A	т с	A	G	Т	С	ТТ	G T	А	G C	C	A C	C A	T A
CsWRKY23	G				-	-			-		-	-		-		-	-		A	G	А	G	A	G	C (	G G	С	С	А	A C	G	A C	A	Т	G	A C	G	G	СТ	G	T G	A T	С	A C	Т	A C	с	T A
CsWRKY25	G											-							A	G	А	G	A	G	A 1	ГС	C	G	А	A C	G	A T	С	С	A	G	G	Ă,	G	T	T G	A T	Т	GT	A	A C	G	ТА
CsWRKY33	Ğ											-							A	A	C	G	Т	G	C (	СТ	Ť	Ă	G	A C	G	A T	C	Ċ	A	A C	Ă	A '	G	Ċ	T G	A T	т	GT	A	A (	Т	ТА
CsWRKY4	G																		A	 A	Т	C	A	G	c (	G G	T	Δ	G	A A	A	A T	c	ĉ	Δ	A A	Т	G	' A	G	T A	A T	Δ	A T	A	A (	A	ТА
CsWRKV46	G											_			_				۵	G	Δ	G	Δ	т	c (	о ОТ	Δ	C	G		G	Δ T	C	c	G	т		Δ ,	T	G	ТА		т		Δ	A (		ТА
CmWRKV21	G											-	-	-	-	-	_		Δ	Δ	Δ	G	Δ	G		γ Δ	G	G	G		G		T	c	G	ΔΔ	C C	т	T	G	ТТ	TT	Δ		Δ	A (	G	ТА
SIWDKV2	G		-		-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-		1	G	C	G	1	т	GI	г т	т	c	1	G T	G		C	C	1				чт т	G	T G	GT	G		T			тл
CIWDEVV1C	4	, I	, ,	г		- т	- т	_	- т		ч т	- C	_	- C	- т	c	- т	с. с.	0		4	1	л ,	т			1	т	т					т	A			т	T	4	T A	TT	4	T				
SIWKK120 CIWDEV27	A	A	A	1 /	1 A	. 1	1	A	1	A C	J I	U	A	U	1	U	1	ιι		A	A	A	A	1			A	T	1	A U	A A	- 1 - T	A	C	A		A	1 . T	1 I	A	I A	1 1	А	I A		A I	A T	
SIWKK12/	G	·			-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-		P.	A	A	G	G	G	AU		A	1	A	A A	G		1	C	A	A G	r U	1 .		G		A I	1	A C		A C		
SIWKKY 33	G	•			-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-		P.	A	Ċ	G	6	G	C 1	1 6	C	A	A	GI	G	A C	C	C	1	A A	A	6	A	G	I C	A I	A	A C	A	A (	A	I A
SIWRKY52	G	ŀ			-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-		A	G	A	G	G	T	CI	A T	C	C	C	A T	A	A T	C	C	A	A A	A	T	A	G	I G	A I	T	A C	A	G 1	A	TA
SIWRKY53	C	÷			-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-		A	A	A	G	A	Т	G	r G	C	A	G	A G	G	A C	A	G	A	A C	A	A	C	T	II G	A I	C	A C	A	A C	C T	T A
SIWRKY56	G	•			-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-		A	G	A	G	G	G	C 1	Г Т	С	Т	С	A T	G	A T	С	С	A	A A	A	G	C T	G	ТТ	A T	С	A C	C C	A C	C A	ΤA
SIWRKY60	G	ŀ.			-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-		A	. А	C	G	A	G	A (	C A	A	G	G	A G	G	A T	T	С	Т	C G	i G	Τ.	A T	G	T G	A T	А	A C	C	A C	C C	ΤA
SIWRKY62	Т	С	G	A (	C T	Т	Т	Т	А	T A	A T	А	Т	A	G	G	Т	A C	A	A	A	G	A	A	G (	C A	Т	Т	G	A A	G I	A T	С	С	A	T C	A	A '	T	Т	T A	G T	A	G G	iΤ	G T	Γ A	ТА
		•																	(			p	_								1	D		p							V	L	М	т		Т	•	1
																						ĸ				~ -	-				1			1							,	1/	141	1		1	1	
																										- 35	)																					

(F) WRKY 單雙子葉 4371 bp-4421 bp 之區間

CaWRKY1 CsWRKY18	4371 C A	4372 4 A A	373 4374 A A A A	4375 43 G C C A	76 4377 T A	4378 C G	4379 4380 T C T G	) 4381 C G	4382 4383 T T A G	4384 C A	4385 4386 T A G G	4387 C A	4388 43 A A A C	889 4390 C A	) 4391 T G	4392 C A	4393 T T	4394 4395 G T C C	4396 A G	6 4397 C A	4398 4 G 0 C 0	399 4400 G A C C	0 4401 T G	4402 G G	4403 440 G C G A	4 4403 T A	5 4406 T T	4407 A G	4408 44 G A T <b>T</b>	409 4410 C C	4411 A A	4412 441 A T T A	3 4414 T G	4415 G T	4416 T C	4417 4418 T C A C	8 4419 A T	4420 4421 A T T A
CsWRKY21	-		-		-	-		-		-		-		-	-	-	-		-			-	-			-	-	-		-	-	- 8	$\overline{\gamma}$	9174	-	- A -	致日	
CsWRKY23	G	A A	A A	C A	C	A	T C	G	A G	A	G A	G	CG	G	C	C	A	A C	G	A	C	A T	G	A	G G	G	С	T	GT	G	A	ТС	A	C	T	A C	C	ТА
CSWKKY25 CoWDEV22	G	A	A A	C A	C	G		G	A G	A	G A	G	A I	С - т	Ст	G	A	A C	G	A	I ( T (		A	G	CG	A	I T	G		G	A		G	T	A	A C	G	I A T A
CsWRK155	Δ	Δ	A G		C	Δ		G		Т		G		G	Т	A A	G		Δ	Δ	T (		Δ	Δ		G	C	Δ	GT	Δ	Δ		Δ	T	Δ		Δ	Т Д
CsWRKY46	A	A	A A	C G	A	G	T A	G	A G	A	GA	T	C C	T	A	C	G	A A	G	A	T		-	-		-	-	-		C	G	T C	C	A	T	T G	T	AA
GmWRKY21	G	A A	A A	A G	G	G	T G	G	A A	A	G A	G	A C	А	G	G	G	A T	G	А	C	C C	G	А	A C	Т	А	Т	G T	Т	Т	T A	A	C .	A	A C	G	T A
SIWRKY2	A	C I	A G	A G	Т	Т	т т	С	т с	Т	ТТ	Т	T G	G	Т	Т	Т	ТС	A	Т	T 1	G	Т	G	T T	Т	А	С	C C	A	С	т -	-	Т	C	Г С	Т	A A
SIWRKY26	А	A A	A T	A A	С	Т	Т Т	G	A T	С	A A	G	G G	Т	А	А	Т	C A	А	Т	T (	G A	Т	G	A T	С	А	С	C C	Τ	Т	T A	А	Т	Т	C T	Т	T G
SIWRKY27	А	A 7	- 1		С	Τ	T T	G	ТТ	C	A T	G	A G	C	Т	А	G	<u>T</u> T	Т	Т	T (	G G	G	G	T T	G	А	-		G	Т	T A	G	G	С	Г С	А	A A
SIWRKY33	A	G	A A	C C	T	A	 	G	G A	Т	C A	Т	TG	T	Т	С	A	A A	С	A	A (	C C	A	G	T G	A	A	G	T T	G	A	T C	T	A '	Т	- T	G	G A
SIWRKY52	A	A A	A A	C A	A	G	T G	G	A G	A	G A	T	C A	C	A	A	G	A T	G	G	T (	A	T	A	T A	A	C	С	A A	L T	A	ТТ	С	A	C	Γ Α	T	A -
SIWKK 155 SIWDEV56	G	1	A G		A	T	I I T T	A	I C	ſ		A T		r A C	A	I T	I G		G	A			L A	A	 т л	-	A	-	 G /	I G	1	I A T T	I G	A T	т	JA TA	А	A G
SIWRKY60	C A		а U 7 Т		Δ	T	T G	G		C		C	ТА	Δ	Δ	C	T	G T	Т	T	C C		G	C	ТТ	G	Δ	л -	о н 		C A	T G	G	G	G		Δ	G A
SIWRKY62	A	T (	GC	A C	A	T	A G	T	T A	č	T G	A	GG	T	T	T	G	AA	Ť	A	T	G	G	Ă	GG	G	A	-		А	G	T A	A	A	T	T C	A	A C
TaWRKY53	G	A A	A G	C A	С	G	T G	G	A G	С	G C	G	C C	С	Т	G	G	A C	G	А	C (	C C	G	G	C G	A	Т	G	C T	G	G	T G	G	Т	G	A C	Т	Т А
TaWRKY52	G	A A	A G	C G	G	G	T G	G	A G	С	G G	G	A T	С	G	С	G	A T	G	А	C	G A	G	С	G C	Т	Т	С	G T	C	А	T C	А	С	С	A C	С	Т А
TaWRKY51	G	A A	A G	C G	G	G	T G	G	A G	С	G G	G	A C	С	G	G	G	A C	G	А	C (	C C	G	G	C G	Т	А	С	G T	G	G	T G	А	С	C	A C	G	Т А
TaWRKY50	С	A A	A G	C A	G	G	T G	С	A G	С	G T	G	C T	С	А	С	G	G <mark>C</mark>	G	А	C (	C C	G	С	T G	С	Т	С	T T	C	G	A C	G	Т	C	GΤ	G	Т А
TaWRKY48	G	A A	A G	A A	G	G	T G	C	A G	C	G C	A	G	G	С	С	G	A G	G	A	C	A A	G	A	C C	G	Т	G	CT	Т	G	T C	G	C	C	A C	G	ТА
TaWRKY46	G	A A	A G	C T	G	G	T G	G	A G	C	GG	T	CG	i C	A	G	C	A G	G	A	C		T	T	C C	A	T	G	GI	T	G	T C	A	C		A C	C	T A
TaWKK144	G	A		C A	I G	A		G	A A	A	G G	1			C	G	C	A A	G	A			A	A		G	Т	G A	G I C T	G	A	I A T G	A	C	1 C	A C	A G	
TaWRK135	G		I G	C G	G	G		G	A G	C		G		C	G	c	G		G	Δ			G	C	T C	Т	Δ	A C	GT		C	T C	Δ	c	C		C	ТА
OsWRKY79	G	A	G	C A	Ă	A	C C	C	A G	C	GC	T	G	G	A	G	G	C C	G	A	Č (	Č Č	G	T	C G	Å	A	T	T A	C	G	A C	A	T	č	A C	č	ТА
OsWRKY74	G	A A	A G	C A	G	G	T G	C	A G	С	G C	А	C C	G	А	С	G	A G	G	А	C (	G C	G	А	C G	G	Т	G	T T	C	G	A C	G	Т	G	A T	С	Т А
OsWRKY68	G	A A	A G	C A	С	G	T G	G	A G	С	G C	G	C C	A	С	С	G	A C	G	А	C (	C C	G	G	C G	А	Т	G	C T	G	G	T C	G	Т	G	A C	С	Т А
OsWRKY66	С	A A	A G	C A	G	G	T G	G	A G	С	G C	А	G C	С	G	G	А	C C	G	А	C (	C C	С	A	A C	А	Т	G	C T	C C	G	T C	А	Т	С	A C	С	Т А
OsWRKY62	Т	A A	A A	A A	A	Т	T T	A	A T	Т	G C	С	ТТ	Т	С	Т	G	G T	Т	A	T A	A T	A	A	ТТ	Т	Т	Т	C A	A	A	ТТ	Т	C	A	A T	Т	T A
OSWRKY51	G	A A	A G	C A	С	G	T G	G	A G	C	G C	G	A C	C	C	G	A	C C	G	A	C	C	G	T	C C	A	T	G	C I	C	A	T C	G	T	C	A C	C	T A
OsWKK145	G		U U	C A	G	G	I U T C	C	A G			1		G	A	C	U T	A C	G	A			G	G		A	G	C	I A T T		A	U U	G	I T	C	A C	C	I A T A
OswKK139	U T	A I			т	Δ	G T	T		T		A		с : т	C	1			C	A			G	T	C T	G	G	т	і і Т Т	G	А Т	T G	Т	G	T		т	
0500 KK 1102	1	n		Л	1	л	0 1	-	Λ	-	л	л	. 0	1	C	л	Λ	Λ	C	Л	0		0	-		U	U	1		U	1	1 0	_	U		<b>1</b>	1	
		]	K	Ç	/ H		V		Е									D		D		Р										V				Т		

大道

圖二、WRKY 轉錄因子在單子葉及雙子葉植物中核苷酸保守片段

Figure 2. The consvered regions on WRKY transcription factor of monocotyledons and dicotyledons.

- (A) WRKY 轉錄因子在單子葉作物中核苷酸高度相似性片段(8867bp-8902bp之區間),黑色填色為單子葉作物保守片段,灰色填色為單子葉作物高度相似性片段,黑色箭頭為引子設計位置。
- (B) WRKY 轉錄因子在雙子葉植物中核苷酸高度相似性片段(5812bp-5833bp 之區間),黑色填色為雙子葉植物保守片段,灰色填色為雙子葉植物高度相似性片段。
- (C) WRKY 轉錄因子在單子葉及雙子葉植物中核苷酸高度相似性片段(4329bp-4346bp之區間), 藍色填色為單子葉植物高度相似性片段, 灰色填色為單子葉及雙子葉植物高度相似性片段。
- (D) WRKY 轉錄因子在單子葉作物中核苷酸高度相似性片段(9052bp-9092bp之區間),黑色填色為單子葉作物保守片段,灰色填色為單子葉作物高度相似性片段,黑色箭頭為引子設計位置。
- (E) WRKY 轉錄因子在雙子葉植物中核苷酸高度相似性片段(5925bp-5985bp之區間),黑色填色為雙子葉植物保守片段,灰色填色為大部分雙子葉植物保守片段。
- (F) WRKY 轉錄因子在單子葉及雙子葉植物中核苷酸高度相似性片段(4371bp-4421bp之區間),藍色填色為單子葉植物高度相似性片段, 灰色填色為單子葉及雙子葉作物高度相似性片段。

(A) DREB/CBF 單子葉 2411 bp-2430 bp 之區間



DREB/CBF-R2 primer



(C) DREB/CBF 雙子葉 1082 bp-1101 bp 之區間

	1082	1083	1084	1085	1086	1087	1088	1089	1090	1091	1092	1093	1094	1095	1096	1097	1098	1099	1100	1101
AhERF4	Т	А	С	Α	G	Α	G	G	G	Α	Т	С	Α	G	G	С	А	G	С	G
AhERF5	Т	А	С	А	G	А	G	G	С	G	Т	А	С	G	G	С	А	Α	А	G
AhERF6	Т	А	Т	Α	G	G	G	G	Т	G	Т	Т	Α	G	G	С	А	G	Α	G
AtDREB1A	Т	А	С	А	G	Α	G	G	Α	G	Т	Т	С	G	Т	С	G	G	А	G
CaCBF1A	Т	А	С	Α	G	G	G	G	Α	G	Т	Т	А	G	G	С	А	G	А	G
DcDREB-A6	Т	А	С	Α	G	G	G	G	Т	G	Т	Т	Α	G	G	С	А	Α	Α	G
GmDREB1A-2	Т	А	С	C	G	G	G	G	С	G	Т	G	А	G	G	Α	G	G	А	G
GmDREB1B-1	Т	А	С	C	G	С	G	G	С	G	Т	G	А	G	Α	A	G	G	С	G
GmDREB1C-1	Т	А	С	С	G	Α	G	G	Α	G	Т	G	С	G	Т	С	G	С	Α	G
GmDREB1D-1	Т	А	С	C	G	Α	G	G	Α	G	Т	Α	С	G	Α	Α	G	G	Α	G
GmDREB1E-1	Т	А	С	А	G	Α	G	G	G	G	Т	Т	С	G	G	С	А	G	А	G
GmDREB1F-1	Т	А	Т	А	G	G	G	G	Т	G	Т	Α	С	G	G	С	А	Α	Α	G
GmDREB1G-1	Т	А	С	Α	Α	G	G	G	G	G	Т	G	Α	G	G	С	А	G	Α	G
GmDREB1H-1	Т	А	Т	Α	G	G	G	G	Т	G	Т	С	С	G	Α	С	А	Α	А	G
LIDREB1A	Т	А	С	Α	G	Α	G	G	Α	G	Т	Т	С	G	Т	С	Т	C	Α	G
PnDREB1	Т	А	С	А	G	А	G	G	А	G	Т	G	А	G	G	С	А	Α	А	G
		<b>X</b> 7		·	ъ			a			<b>T</b> 7			ъ			0		-	
		Y			к			G			V			к			Q			

## (D) DREB/CBF 雙子葉 1109 bp-1137 bp 之區間

	1109	1110	1111	1112	1113	1114	1115	1116	1117	1118	1119	1120	1121	1122	1123	1124	1125	1126	1127	1128	1129	1130	1131	1132	1133	1134	1135	1136	1137
AhERF4	G	G	А	А	А	А	Т	G	G	G	С	G	G	С	G	G	А	G	Α	Т	Т	С	G	Т	G	А	Т	С	С
AhERF5	G	G	Α	А	А	Α	Т	G	G	G	Т	G	Т	С	Т	G	А	G	Α	Т	С	А	G	Α	С	Т	C	С	С
AhERF6	G	G	А	А	А	А	Т	G	G	G	Т	Т	G	G	С	G	А	G	А	Т	Т	С	G	G	G	А	G	С	С
AtDREB1A	G	G	Т	А	А	G	Т	G	G	G	Т	Т	Т	G	Т	G	А	G	G	Т	Т	А	G	Α	G	А	А	С	С
CaCBF1A	G	G	С	А	А	G	Т	G	G	G	Т	Т	Т	G	Т	G	А	А	G	Т	Α	А	G	Α	G	А	А	С	С
DcDREB-A6	G	G	С	А	А	G	Т	G	G	G	Т	С	G	С	Т	G	А	G	Α	Т	С	С	G	Т	Т	Т	A	С	С
GmDREB1A-2	G	А	Т	А	А	G	Т	G	G	G	Т	А	А	G	Т	G	А	G	G	Т	G	А	G	G	G	А	G	С	С
GmDREB1B-1	G	G	С	А	А	G	Т	G	G	G	Т	G	Т	G	С	G	А	G	G	Т	G	С	G	С	G	А	G	С	С
GmDREB1C-1	А	А	C	А	А	G	Т	G	G	G	Т	С	Т	G	С	G	А	G	А	Т	G	С	G	А	G	Т	C	С	С
GmDREB1D-1	А	А	С	А	А	G	Т	G	G	G	Т	С	Т	G	С	G	А	G	G	Т	Т	С	G	Т	G	Т	Т	С	С
GmDREB1E-1	А	А	С	А	G	G	Т	G	G	G	Т	G	Т	G	Т	G	А	А	G	Т	Т	С	G	Т	G	А	А	С	С
GmDREB1F-1	А	А	С	А	А	А	Т	G	G	G	Т	G	Т	G	Т	G	А	Α	А	Т	А	А	G	G	G	А	А	С	С
GmDREB1G-1	G	G	G	А	А	G	Т	G	G	G	Т	G	Т	G	С	G	А	G	C	Т	G	С	G	Α	С	А	Α	С	С
GmDREB1H-1	G	G	А	А	А	G	Т	G	G	G	Т	Т	Т	G	Т	G	А	А	C	Т	Т	А	G	G	G	А	А	С	С
LIDREB1A	G	G	Т	А	А	А	Т	G	G	G	Т	Т	Т	G	Т	G	А	G	G	Т	А	А	G	А	G	А	G	С	С
PnDREB1	G	А	Т	А	А	А	Т	G	G	G	Т	А	Т	G	Т	G	А	А	G	Т	А	А	G	А	G	А	А	С	С
	-																					-							
		G			Κ			W			V			С			E			V									

(E) DREB/CBF	單雙子	子葉 2	543 bp	- 256	2 bp 🗠	之區間													Not of or other	Kr.
	2543	2544	2545	2546	2547	2548	2549	2550	2551	2552	2553	2554	2555	2556	2557	2558	2559	2560	2561	2562
AhERF4	Т	А	С	А	G	А	G	G	G	А	Т	С	А	G	G	С	Α	G	C	G
AhERF5	Т	А	С	А	G	А	G	G	С	G	Т	А	С	G	G	С	Α	A	А	G
AhERF6	Т	А	Т	А	G	G	G	G	Т	G	Т	Т	A	G	G	С	Α	G	Α	G
AtDREB1A	Т	А	С	А	G	Α	G	G	А	G	Т	Т	С	G	Т	С	G	G	А	G
CaCBF1A	Т	А	С	А	G	G	G	G	А	G	Т	Т	A	G	G	С	А	G	А	G
DcDREB-A6	Т	А	С	А	G	G	G	G	Т	G	Т	Т	А	G	G	С	А	А	А	G
GmDREB1A-2	Т	А	С	C	G	G	G	G	С	G	Т	G	A	G	G	A	G	G	А	G
GmDREB1B-1	Т	А	С	С	G	С	G	G	С	G	Т	G	А	G	A	А	G	G	С	G
GmDREB1C-1	Т	А	С	С	G	Α	G	G	А	G	Т	G	С	G	Т	С	G	С	А	G
GmDREB1D-1	Т	А	С	С	G	Α	G	G	А	G	Т	А	С	G	А	А	G	G	А	G
GmDREB1E-1	Т	А	С	Α	G	Α	G	G	G	G	Т	Т	С	G	G	С	Α	G	А	G
GmDREB1F-1	Т	А	Т	Α	G	G	G	G	Т	G	Т	А	С	G	G	С	Α	Α	А	G
GmDREB1G-1	Т	А	С	Α	А	G	G	G	G	G	Т	G	А	G	G	С	Α	G	А	G
GmDREB1H-1	Т	А	Т	А	G	G	G	G	Т	G	Т	С	С	G	А	С	А	Α	А	G
LpCBF3	Т	А	С	С	G	С	G	G	С	G	Т	G	С	G	G	С	G	С	А	G
PnDREB1	Т	А	С	А	G	Α	G	G	А	G	Т	G	А	G	G	С	А	А	А	G
LIDREB1A	Т	А	С	А	G	А	G	G	А	G	Т	Т	С	G	Т	С	Т	С	А	G
OsDREB1A	Т	Т	С	С	G	С	G	G	С	G	Т	G	С	G	G	С	G	G	А	G
OsDREB1B	Т	А	С	С	G	С	G	G	С	G	Т	G	С	G	G	С	G	G	С	G
TaDREB2	Т	А	Т	С	G	С	G	G	С	G	Т	G	С	G	G	Α	Т	G	С	G
TaDREB3	Т	А	С	С	G	С	G	G	С	G	Т	G	С	G	С	С	G	G	С	G
ZmDREB1A	Т	Т	С	С	G	С	G	G	С	G	Т	G	С	G	G	С	G	G	С	G
ZmDREB2A	Т	А	С	С	G	Т	G	G	А	G	Т	G	A	G	G	С	А	G	С	G
		Y			R		·	G			V			R			R			

(F) DREB/CI	BF.	單雙-	子葉	258	5 bp	- 26	13 br	)之	區間																	X	1010101	
	2584	2586	2587	2588	2589	2590	2591	2592	2593	2594	2595	2596	2597	2598	2599	2600	2601	2602	2603	2604	2605	2606	2607	2609	2610	2611	2612	2613
AhERF4	G	G 2500	A	A	A	A	T	G	G	G	C	G	G	C	G	G	A	G	A	T	T	C	G	G	A	T	C	C
AhERF5	G	G	А	А	А	А	Т	G	G	G	Т	G	Т	С	Т	G	А	G	Α	Т	С	A	G	С	Т	С	С	Ċ
AhERF6	G	G	А	А	А	Α	Т	G	G	G	Т	Т	G	G	С	G	А	G	Α	Т	Т	С	G	G	А	G	С	С
AtDREB1A	G	G	Т	А	А	G	Т	G	G	G	Т	Т	Т	G	Т	G	А	G	G	Т	Т	А	G	G	А	Α	С	С
CaCBF1A	G	G	С	А	А	G	Т	G	G	G	Т	Т	Т	G	Т	G	А	А	G	Т	А	А	G	G	А	A	С	С
DcDREB-A6	G	G	С	А	А	G	Т	G	G	G	Т	С	G	С	Т	G	А	G	Α	Т	С	С	G	Т	Т	Α	С	С
GmDREB1A-2	G	А	T	А	А	G	Т	G	G	G	Т	Α	А	G	Т	G	А	G	G	Т	G	А	G	G	А	G	С	С
GmDREB1B-1	G	G	С	А	А	G	Т	G	G	G	Т	G	Т	G	С	G	А	G	G	Т	G	С	G	G	А	G	С	С
GmDREB1C-1	A	А	C	А	А	G	Т	G	G	G	Т	С	Т	G	С	G	А	G	Α	Т	G	С	G	G	Т	С	С	С
GmDREB1D-1	Α	Α	С	А	А	G	Т	G	G	G	Т	С	Т	G	С	G	А	G	G	Т	Т	С	G	G	Т	Т	С	С
GmDREB1E-1	Α	Α	С	А	G	G	Т	G	G	G	Т	G	Т	G	Т	G	А	А	G	Т	Т	С	G	G	А	А	С	С
GmDREB1F-1	Α	А	С	А	А	А	Т	G	G	G	Т	G	Т	G	Т	G	А	А	Α	Т	А	А	G	G	А	А	С	С
GmDREB1G-1	G	G	G	А	А	G	Т	G	G	G	Т	G	Т	G	С	G	А	G	С	Т	G	С	G	С	А	А	С	С
GmDREB1H-1	G	G	А	А	А	G	Т	G	G	G	Т	Т	Т	G	Т	G	А	А	С	Т	Т	А	G	G	А	А	С	С
LpCBF3	G	G	G	С	G	G	Т	G	G	G	Т	G	Т	G	С	G	А	G	G	Т	G	С	G	G	Т	G	С	С
PnDREB1	G	А	Т	А	А	А	Т	G	G	G	Т	А	Т	G	Т	G	А	А	G	Т	А	А	G	G	А	А	С	С
LIDREB1A	G	G	Т	А	А	А	Т	G	G	G	Т	Т	Т	G	Т	G	А	G	G	Т	А	А	G	G	А	G	С	С
OsDREB1A	G	G	G	А	G	G	Т	G	G	G	Т	G	Т	G	С	G	А	G	G	Т	G	С	G	G	Т	G	С	С
OsDREB1B	G	G	G	А	G	G	Т	G	G	G	Т	G	Т	G	C	G	А	G	G	Т	G	С	G	G	Т	G	С	С
TaDREB2	G	G	С	А	А	G	Т	G	G	G	Т	G	Т	С	G	G	А	G	А	Т	С	А	G	G	А	G	С	С
TaDREB3	G	G	G	С	G	G	Т	G	G	G	Т	G	Т	G	С	G	А	G	G	Т	G	С	G	С	Α	G	С	С
ZmDREB1A	G	G	С	С	G	G	Т	G	G	G	Т	G	Т	G	C	G	А	G	G	Т	G	С	G	G	Т	С	С	С
ZmDREB2A	G	G	G	А	А	G	Т	G	G	G	Т	Т	G	С	Т	G	A	А	А	Т	А	А	G	G	А	G	С	С
		G			Κ			W			V			С			Е			V		_	R			S		-

圖三、DREB/CBF 轉錄因子在單子葉作物及雙子葉植物中核苷酸保守片段

Figure 3. The consvered region on DREB/CBF transcription factor of monocotyledons and dicotyledons.

- (A) DREB/CBF 轉錄因子在單子葉作物中核苷酸高度相似性片段(2411bp-2430bp 之區間),黑色填色為單子葉作物保守片段,灰色填色為單子葉作物高度相似性片段,黑色箭頭為引子設計位置。
- (B) DREB/CBF 轉錄因子在單子葉作物中核苷酸高度相似性片段 (2453bp 2481bp 之區間),黑色填色為單子葉作物保守片段,灰色填 色單子葉作物高度相似性片段,黑色箭頭為引子設計位置。
- (C) DREB/CBF 轉錄因子在雙子葉植物中核苷酸高度相似性片段 (1082bp 1101bp 之區間),黑色填色為雙子葉植物保守片段,灰色填 色為雙子葉植物高度相似性片段。
- (D) DREB/CBF 轉錄因子在雙子葉植物中核苷酸高度相似性片段 (1109bp 1137bp 之區間),黑色填色為雙子葉植物保守片段,灰色填色雙子葉植物高度相似性片段。
- (E) DREB/CBF 轉錄因子在單子葉及雙子葉植物中核苷酸高度相似性片段 (2543bp 2562bp 之區間),藍色填色為單子葉植物高度相似 性片段,綠色填色為雙子葉植物高度相似性片段,灰色填色為單子葉及雙子葉植物高度相似性片段,黑色填色為單子葉、雙子葉植物保守片段,紅色方框為單子葉及雙子葉植物具差異之高度相似性序列處。
- (F) DREB/CBF 轉錄因子在單子葉及雙子葉植物中核苷酸保守片段 (2585bp-2613bp之區間),藍色填色為單子葉植物高度相似性片段, 灰色填色為單子葉及雙子葉植物高度相似性片段,黑色填色為單子葉及雙子葉作物保守片段。

#### (A) COR15 單雙子葉 404 bp-444 bp 之區間

	COR15-F1 primer											COR15-F2 primer						æ.														
CsCor15A CbCor15A AtCOR15A BnCor15B Wcor15	404 405 406 A T G A T G A T G A T G A T G A T G A T G M	407 40 G C G C G C G C G C G C A	8 409 G G G G G G	410 411 A T A T A T A T T G M	412 G G G G G	413 4 T 0 T 0 T 0 T 0 T 0 T 0	414 415 C T C T C T C A C A T S	416 41 T T T T T T T T T T T T F	7 418 C C C C G	419 T T T T C	420 4 C 4 C 4 C 4 C 4 C 4 C 4 S	421 4 A - A - A - A - A -	122 4   C C	23 424 - - - - C A	4 425 - - - T	426 G G G A	427 G G G G G G	428 A A A A G	429 43 G C G C G C G C A C	30 43 T T T T T T	1 432 G G G G G G	433 T T T T - V	434 T T T T -	435 C C C C -	436 4 T C T C T C T C C C	37       433         2       A         2       A         2       A         2       A         2       A         2       A         2       A         2       A         2       A	8 439 C C C G A T	<ul> <li>440</li> <li>T</li> <li>T</li> <li>T</li> <li>T</li> <li>T</li> </ul>	441 G G G G T	442 G G G G A G	443 - C C T G A	144 A A A A A
(B) COR1.	(B) COR15 單雙子葉 1497 bp-1532 bp 之區間																															
CsCor15A CbCor15A AtCOR15A BnCor15B Wcor15	1497     1498     1499       G     G     C       G     G     A       G     G     T       G     G     A       G     G     G       G     G     G	6 1500 G G G G G T	1501 150 A G A G A G A G A G	02 1503 A A A A A A	1504 A A A A A	1505 A A A A A	1506 15 G C G C G C G C G C G C	07 1508 - - - T	1509 - - - T	1510 A A G A A	1511 A A A G	1512 A A A A A	1513 A A A A G	1514 G G G G G	1515 A A A A C	1516 C C C C G	1517 T T T T T	1518 A A A G	1519 C C C C C	1520 G G G A	1521 T T T T T	1522 T T T T G	1523 G G G G G	1524 T T T A T	1525 T A T T A	1526 G G G G G	1527 A A A A A	I528 G A G A	1529 A A A A A	1530 A A A A A	1531 A A A A A	1532 A A A A A
	COR15-R1 primer															COI	стэ-к	∠ pri	mer													

圖四、COR15 基因在單子葉及雙子葉植物中核苷酸高度相似性片段

Figure 4. The high similarity regions on *COR15* gene of monocotyledons and dicotyledons.

(A) COR15 基因在單子葉及雙子葉植物中核苷酸高度相似性片段 (404bp-444bp), 灰色填色為單子葉及雙子葉植物高度相似性片段, 黑色填色為單子葉及雙子葉植物保守片段, 黑色箭頭為引子設計位置。

(B) COR15 基因在單子葉及雙子葉植物中核苷酸高度相似性片段 (1497bp-1532bp), 灰色填色為單子葉及雙子葉植物高度相似性片段, 黑色填色為單子葉及雙子葉植物保守片段。 (三)胺基酸保守序列組成

1. HSF 轉錄因子

針對 HSF 轉錄因子之胺基酸序列進行多重序列各別單子葉作物、雙子葉植物 及單雙子葉植物胺基酸序列,各別茄科作物及十字花科植物之分析結果詳見附圖 五、附圖六,在各物種中,轉譯起始點-Methionine 至 DNA binding domain 前之胺 基酸序列具有極高的歧異度(此區間約150個胺基酸,僅有14-15個胺基酸在物種 間具有高度相似性), 而在 DNA binding domain 及 HR A/B Domain 之胺基酸序列有 極高的保守及高度相似性,因此節錄 DNA binding domain 及 HR A/B Domain 進行 重點探討比較單子葉作物、雙子葉植物及單雙子葉植物之胺基酸序列。針對耐溫 度逆境功能性進行分群,耐高溫及耐低溫之轉錄因子無群間特有保守序列,無法 以轉錄因子功能性進行分群。分析單子葉作物 (圖五 A)、雙子葉植物 (圖五 B)與 單子葉及雙子葉植物(圖五 C) 中均發現其 DNA binding domain 具高度保守性,序 列分析結果皆可分為兩大群,兩大群間具有群間特有之胺基酸高度相似性序列。 在單子葉作物中 DNA binding domain 在物種間之長度 82-94 個胺基酸間,其中在 玉米的ZmHSF12-P1蛋白質中具有15個胺基酸之插入 (圖五A);在雙子葉植物中, DNA binding domain 之胺基酸長度介於 70 – 95, 其中在阿拉伯芥的 AtHSFA2(NP.001118388.1)有 24 個胺基酸的缺失、在大豆的 GmHSF17 有 10 個胺 基酸的插入及番茄的 SIHSFB-2a-like 有7胺基酸序列之插入,在雙子葉植物中 DNA binding domain 胺基酸序列長度有差異,但分群結果無法將單子葉及雙子葉植物依 胺基酸序列差異而分群,胺基酸保守序列進行分群,可分為兩大群在第8、16-17、 37、49、98 及 110 個胺基酸可清楚地辨別第一大群及第二大群之差異, 第8 個胺 基酸,第一大群 P、第二大群多為 A 或 T;第 16-17 個胺基酸,第一大群多為 DM、 第二大群多為 QL;第 37 個胺基酸,第一大群大多為 S、第二大群大為 N;第 49 個胺基酸,第一大群多為 D、第二大群多為 R;第 98 個胺基酸,第一大群多為 D、 第二大群多為V;第110個胺基酸第一大群多為L、第二大群多為R(圖五C)。

分別針對單子葉作物(圖六 A)、茄科作物(圖六 B)、十字花科植物(圖六 C)、 雙子葉植物(圖六 D)奧單子葉及雙子葉植物(圖六 E)之 HR A/B Domain 進行多重序 列比較分析,分析胺基酸保守序列組成,結果顯示 HR A/B Domain 在物種中具有 高度相似性,但在不同物種中之 HR-A core 區域具有胺基酸序列插入,如單子葉植 物之水稻的 OsHSFA2C homology X1、OsHSFA2C homology X2 及玉米的 ZmHSF10、 ZmHSF7(圖六 A),茄科作物之番茄的 SIHsfB4(圖六 B),雙子葉植物之大豆的 GmHSF25 及番茄的 SIHSF24(圖六 D)。接著依 HRA/B Domain 胺基酸序列分析, 在不同物種間皆可分為兩大群,群間具辨別差異之胺基酸高度相似性片段,群間 無法依據胺基酸序列清楚分出單子葉植物及雙子葉植物之差異,但在第 47、49-50、 52、62、67、69-70及 73 個胺基酸可清楚地辨別第一大群及第二大群之差異, 第 47 個胺基酸,第一大群多為 Q、第二大群多為 E;第 49-50 個胺基酸,第一大 群多為 QQ、第二大群多為 NE;第 52 個胺基酸,第一大群多為 T、第二大群多為 L;第 62 個胺基酸,第一大群多為 R、第二大群多為 E;第 67 個胺基酸,第一群 多為 E、第二大群多為 K;第 69-70 個胺基酸,第一大群多為 RQ、第二大群多為 LC;第 73 個胺基酸,第一大群多為 M,第二大群多為 I(圖六 E)。

比對胺基酸高度相似性片段與核苷酸高度相似性片段之關係,結果顯示兩處 核苷酸高度相似性片段轉譯後之胺基酸序列與轉錄因子之 DNA binding domain 胺 基酸序列一致,圖五 C 之黑色箭頭標示處則為兩處胺基酸對應核苷酸序列高度相 似性片段所在位置,因此針對核苷酸連續高度相似性片段設計引子具有其參考價 值。

2. WRKY 轉錄因子

針對 WRKY 轉錄因子進行多重序列比較在單子葉作物及雙子葉植物之胺基 酸序列分析,茄科作物及雙子葉植物之分析結果詳見附圖七、附圖八,在轉譯起 始點- Methionine 至 WRKY domain 前之區間,胺基酸序列在物種間具有極高的歧 異度(此區間共 624 個胺基酸僅只 14 個胺基酸具高度相似性),因此節錄在物種間 高度保守之WRKY轉錄因子DNA binding domain之WRKY Domain 及Zinc fingers 進行物種間序列保守探討。在單子葉作物(圖七 A)、單子葉及雙子葉植物(圖七 B)中,WRKY Domain 及 Zinc-fingers 有高度的相似性,且在物種間WRKY domain 可分為WRKYGQK 及WRKYGKK 兩種類型,並依其胺基酸序列相似性可分為兩 大群,群間具可辨別差異之胺基酸高度相似性序列。在單子葉及雙子葉植物中, 胺基酸保守序列分群結果,第一大群具單子葉及雙子葉植物,第二大群僅有單子 葉作物劃分在裡面,並在第 31-34、44、67-69、76-77 個胺基酸序列可清楚地 辨別兩大群之差異,第 31-34 個胺基酸中,第一大群多為VKGN、第二大群多為 IQNS 或 ILGA;第 44 個胺基酸,第一大群多為S、第二大群多為T;第 67-69 個胺基酸,第一大群多為VIT、第二大群多為YDV 及 FDV;第 76-77 個胺基酸, 第一大群多為NH、第二大群多為TC (圖七 B);並依耐逆境功能進行細部分群, CsWRKY46、TaWRKY51、TaWRKY51、TaWRKY52、GmWRKY21、TaWRKY44、 CsWRKY21 及 CsWRKY18 在低溫、乾旱及鹽害逆境皆有表現,且 CsWRKY46 及 TaWRKY46 兩個轉錄因子間之胺基酸序列具高度相似性,雖細部分群無群間特有 之高度相似性序列,但不同物種之轉錄因子皆位於第一大群。

針對胺基酸高度相似性片段比對其與核苷酸高度相似性片段之關係,發現核 苷酸高度相似性片段轉譯後之胺基酸序列與 WRKY domain 上之序列一致,證實了 核苷酸與胺基酸位置轉錄及轉譯的正確性,箭頭標示處為兩處高度相似性片段所 在位置(圖七 B),因此針對WRKY轉錄因子核苷酸連續高度相似性片段設計引子, 具有其參考及利用價值。

3. DREB/CBF 轉錄因子

就 DREB/CBF 轉錄因子之胺基酸序列分別進行多重序列比較單子葉作物、豆 科作物、雙子葉植物及綜合單子葉與雙子葉植物之胺基酸序列分析,在 DREB/CBF 轉錄因子轉譯起始點- Methionine 至 AP2 domain 前之胺基酸序列具有高度相似性, 其高度相似性序列為 RKKFRETRH (NSL 序列), DREB/CBF 轉錄因子針對耐溫度 逆境之功能進行分群, 耐高溫及耐低溫之轉錄因子無群間特有高度相似性序列, 因此無法以耐高溫及低溫之功能性進行分群。單子葉作物 (圖八 A)、豆科作物(圖 八 B)、雙子葉植物(圖八 C)及綜合單子葉與雙子葉植物(圖八 D)皆有發現。AP2 Domain 具有高度保守性序列, 其序列分別為 YRGVTQ/R、RL/IWLGT 及 AARAH/YD, 此保守序列皆可見於不同物種間, 可知 AP2 domain 在物種間具極高 的保守性, 最後依據 DREB/CBF 轉錄因子之胺基酸序列保守性可分為兩大群, 群 間具有可辨別差異之胺基酸序列。在單子葉及雙子葉作物中, 分群結果無法清楚 分出單子葉作物及單子葉作物之差異, 但在 63、65、75、85、90 及 95 個胺基酸 可清楚地辨別群間之差異,在第 63 個胺基酸,第一大群多為 C、第二大群多為 A; 第 65 個胺基酸,第一大群多為 V、第二大群多為 I;第 75 個胺基酸,第一大群多 為 I、第二大群多為 L;第 85 個胺基酸,第一大群多為 M、第二大群多為 E和 D; 第 90 個胺基酸,第一大群多為 H、第二大群多為 Y;第 95 個胺基酸,第一大群 多為 L、第二大群多為 R(圖八 D)。

比對高度相似性片段核苷酸與胺基酸序列之相關性,發現兩處 DREB/CBF 轉錄因子之核苷酸高度相似性序列轉譯後之蛋白質序列,與 AP2 domain 上之胺基酸序列具高度保守性,因此,可得知核苷酸與胺基酸序列轉錄及轉譯位置之正確性, 黑色箭頭標示處則為兩處片段所在位置(圖八 D),因此針對核苷酸連續高度相似性 片段設計引子,具有其參考價值。

4. COR15 基因

針對 COR15 基因胺基酸序列進行多重序列比較雙子葉植物、單子葉植物及雙 子葉植物胺基酸序列保守組成,在雙子葉植物 (圖九 A)中,胺基酸序列具有高度 相似性,其高度相似性片段為第 51-100 個胺基酸間,其中在第 57、60、76、80-81、83 及 86 個胺基酸在物種間具高度相似性,其餘片段在物種間皆為保守序列, 並依序列之保守性可將雙子葉植物分為兩群,第一群包含阿拉伯芥,第二群包含 油菜、薺菜及亞麻薺,群間具有可區別差異之胺基酸序列;在單子葉及雙子葉作 物中(圖九 B),依序列保守性可分為兩群,第一群包含雙子葉植物,第二群為 單子葉作物(小麥),群間具有可區分差異之胺基酸序列,COR15 基因胺基酸序 列在單子葉及雙子葉植物中具相似性,在第1-2 個胺基酸(MA),第4 及第6 個胺 基酸(S),第13 及第62 個胺基酸(G),第46 個胺基酸(F),第52 個胺基酸(R),第 68 個胺基酸(L),第72 個胺基酸(N),第76-77 個胺基酸(AT),第83 個胺基酸(A), 第85 個胺基酸(D),第88 個胺基酸(T),第90、106 及 177 個胺基酸(K),第102 個胺基酸(E),第109 個胺基酸(V),第133 個胺基酸(A),共21 個胺基酸在單子葉 及雙子葉作物中具保守性,但因單子葉植物取樣過少,無法精確討論 COR15 基因 在單子葉及雙子葉植物中特有之高度相似性序列之差異。

(A)HSF	單子葉 DNA binding domain	HR-A/R	NI S	NES	A THE A THE
OsHSFA2C homology X1 OsHSFA2C homology X2 ZmHCE10	93 T P F L T K T Y Q <mark>L</mark> V E - D P A V D D V I S V 93 T P F L T K T Y Q L V E - D P A V D D V I S V 93 T P F L T K T Y Q L V F - D P A V D D V I S V	N E D G S T F V V W R P A E F A R D L L P K Y F N E D G S T F V V W R P A E F A R D L L P K Y F	K H N N F S S F V R Q L N T Y	GFRKIVPDRWE	F A N D C F R R G E K R L L C D I H R R K F A N D C F R R G E K R L L C D I H R R K
ZmHSF10 ZmHSF7 ZmHSF20 OsHSFB2A ZmHSF2	93 TPFLTKTYQLVD-DPAVDDVTS 93 TPFLSKTYQLVD-DPAVDDTIS 93 PPFLTKTYAMVE-DSATDDTIS 93 PPFLTKTYAMVE-DPSTDETIS 93 PFLTKTYAMVE-DPSTDETIS	N E D G S 1 F V V W K P A E F A K D L L P K Y F N D D G S A F I V W R P A E F A R D L L P K Y F N D T G T A F V V W R P A E F A R D L L P K H F N D S G T A F V V W R P A E F A R D L L P K H F	K H N N F S S F V K QL N I Y K K H N N F S S F V R QL N T Y K K H S N F S S F V R QL N T Y K K H S N F S S F V R QL N T Y	G F K K W V P D R WE 	FANDFFRRGEKKLLCDIHRKK FANDCFRRGEKKLLCDIHRKK FANDGFRRGEKHLLGGIQRRK FANDCFRRGEKHLLGGIQRRK
ZIMHSF2 ZmHSF6 OsHSFC2A OsHSFC2B OsHSFA6A	93 P P F L S K T Y L WV D - D P A T D A VV A 93 P P F L S K T Y D L V N - E P A L D G V I S V 93 A P F V A K T Y R MV D - D P A T D G V I A 93 A P F V WK T Y R MV E - D P G T D G V I G V 94 A P F V A K T Y F MV A - D A A T D A V V S	I F L O F S F V V A N Q A E F C K D L L F K F G A A G N S F V V W D P S T F A R D V L P H N F G R D S N S F V V A D P F A F S Q T L L P A H F G K G N N S F V V A D P F V F S Q T L L P A H F	K H N N F S S F V K Q L N T 1 K H N N F S S F V R Q L N T Y K H S N F S S F V R Q L N T Y K H N N F S S F V R Q L N T Y K H A N F S S F V R Q L N T Y	G F R K V D P D R WE	F A H E D F L R D S K H L L K R I V R R F A H V S F L R G Q T H L L R R I V R R S F A H A S F L R G Q T H L L R N I V R R G F A H A S F L R G Q K H I K N I K R R
ZmHSF12-P1 ZmHSF12-P2 ZmHSF8 ZmHSF9	94 P P F L A K T F E L V E - D P A T D A V I S V 93 P P F L A K T F E L V E - D P A T D A V I S V 93 A P F L T K V Y D M V S - D P A T D A V I S V 93 A P F L T K V Y D M V S - D P A T D A V I S V	G A A R N S F V V W D P H A F A A G H L P R R F G A A R N S F V V W D P H A F A A G H L P R R F S A G G G S F V I W D S H V F E R D L L P R H F S A G G G S F V I W D S H V F E R D L L P R H F	K H G N F S T F L R Q L N T Y V R N H I S Q K H G N F S T F L R Q L N T Y K H N H F T S F I R Q L N T Y K H N H F T S F I R Q L N T Y K H N H F T S F I R Q L N T Y	F VI N K H C N G F R K V S P D R WE I G F R K V S P D R WE I G F H K V D P D R WE I G F H K V D P D R WE I	F A H T D F L A G Q R H L L V N I R R R R F A H T D F L A G Q R H L L V N I R R R R WA N E G F I K G Q K H L L K T I K R K K
ZmHSF14 ZmHSF30 OsHSFA2A ZmHSF13	93 APFLTKVYDMVS - DPATDAVISV 93 PPFLTKTYDMVD - DSDTDLIVSV 93 PPFLCKTYEVVD - DPGTDTVISV 93 PPFLTKTFDLVA - DPATDEVISV	/ S A A G G S F V I W D S H A F E R D L L P R H F / S A T N N S F V V W D P H A F A T V L L P R H F / G F A G N S F V V W D A N A F A A V L L P R Y F / G R A G N S F V V W D P H V F A A V L L P R F F	K H N H F T S F I R QL N T Y K H N N F S S F V R QL N T Y K H S N F S S F V R QL N T Y K H N N F S S F V R QL N T Y K H N N F S S F V R QL N T Y		WANEGFVKGQKHLLKTIKRKK FANEGFLRGQRHLLKNIRRK FANEGFLRGKKELLKTIKRRR – II FANEGFLRGQRHLLRLIKRRR
OsHSFA2D ZmHSF30 homology 2 OsHSFA2C	82 P P T L L Q A Q Q F L Q L R P P A Q H L P R V 93 P P F L T K T F D L V E - D P A T D A V L S V 93 P P F L T K T Y D L V E - D P A T D G V V S V	V	D H H Q K K E K K H S N F S S F V R Q L N T Y		F A N D G F L R G Q R H L L K MI K R R R F A N E G F L R G Q R H L L K MI K R R K F A N E G F L R G Q R H L L K T I K R R K

(B) HSF 雙子葉 DNA binding domain

		DBD		HR-A/B	1	NLS		NES				
										1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1. 1		
							5					
AtHSFA2 NP 001118388.1 AtHSFA2	1 /0 L I S S Q Q L S F H V T 94 P P P F L T K T Y E M V	SSIAISQ	VLFV	S S I L I W V S Y E N S F V V W D S H K	FSTTLLPRY	S F K H S N F S	SAIK	G F R K I G F R K I	D P D R W E F A N E G F L D P D R W E F A N E G F L	A G Q K H L L K N I K A G O K H L L K N I K	R R R	
BrHsf-10	94 P P P F L T K T Y D M V	E D P A T D T	V V S W S N G R - N	N S F I V W D S H K	FSTTLLPRF	FKHSNFS	SFIROLNTY	G F R K I	D P D R W E F A N E G F L	A G O K H L L K S I K	RRR	
GmHSF34(Class a2)	94 P P P F L S K I F D M V	E D P S T D S	IVSWSMAR-N	NSFVVWDSHK	FSAHILPRY	FKHANFS	SFIRQLNTY	G F R K V	D P D K W E F A N E G F L	AGQRHLLKTIK	RRR	
GmHSF08(Class a2)	94 P P P F L T K T F D V V	E D P S T N D	I V S W S R S R - M	N S F V V W D S H K	FSTTILPRYI	F K H N N F <mark>S</mark>	SFVRQLNTY	<b>G F R K</b> I	D P D K W <b>E F</b> A N E <b>G F</b> L	AGQRQLLKTIK	R R R	
SIHsf30	94 P P P F L S K T Y E M V	E D S S T D Q	VISWSTTR-N	N S F I V W D S H K	FSTTLLPRF	F K H S N F S	S F I R Q L N T Y	<mark>G F</mark> R K V	D P D R W <b>E F</b> A N G G <b>F</b> L	GGQKHLLKTIK	R R R	
StHSF30(Class a2)	94 P P P F L S K T Y E M V	E D S S T D E	VISWSTTR-N	N S F I V W D S H K	FSTTLLPRFI	F K H S N F S	SFIRQLNTY	G F R K V	D P D R W E F A N E G F L	GGQKHLLKTIK	RRR	
SIHsfA6B	94 P P P F L T K T Y E F V	DDQNTNN	VVSWSIGN-M	N S F I V W D P Q T	FAMNLLPRY	FKHSNFS	SFVRQLNTY	G F R K V	N P D H W E F A H E G F L	RGQRHLLKTIR	RRK	
BrHst-20 BrHst 16	94 PPPFLIKIYDLV 94 DDDEI IVTEEIV	EDSKINH	V V S W S Q A K - I	N S F I V W D P Q A T S F V V W D I H S	FSTILLPKF	FKHNNFS	SFVKQLNIY	GFRKV	N P D K W E F A N E G F L E A E D W F F A N E G F I	K G Q K H L L K I I K L C O P H L L K S I K		
BrHsf.15	94 PPPFI IKTEIV		IVSWNRGG - 1	T S F V V W D L H S T S F V V W D L H S	FSFFIIPRH	FKHSNFS	S F V R O I N T Y	GFRKI	E A E R W E F A N E G F I	LGORHILKSIK	RRA	
StHSFA3	94 I P P F L S K T F D L V	EDPLLDS	I I S W G R N G - I	D S F V V W D P V E	FSRLVLPRN	F K H S N F S	S F V R O L N T Y	<b>G F R K I</b>	D A D R W E F A N E G F L	RGKRHLLKNIO	RRK	
SIHSFA3	94 I P P F L S K T F D L V	E D P L L D T	IISWGRNG-H	ESFVVWDPVE	FSRLVLPRNI	FKHSNFS	S F V R Q L N T Y	<mark>G F R K</mark> I	D A D R W E F A N E G F S	RGKRHLLKNIQ	RRR	
AtHsfA1e	94 I P P F L S K T Y D M V	D D P L T D D	VVSWSSGN-N	N S F V V W N V P E	FAKQFLPKY	FKHNNFS	SFVRQLNTY	<b>G F</b> R <b>K</b> V	D P D R W <b>E F</b> A N E G <b>F</b> L	RGQKQILKSIV	RK	
AtHsfA1b(HSF3)	94 V P P F L S K T Y D M V	D D P L T N E	V V S W S S G N - N	N S F V V W S A P E	FSKVLLPKY	F K H N N F <mark>S</mark>	<b>S</b> F V R Q L N T Y	<b>G F</b> R <b>K</b> V	D P D R W <b>E F</b> A N E G <b>F</b> L	RGRKQLLKSIV	R K	т
GmHSF04(Class a1)	94 V A P F L S K T Y D M V	<u>D</u> D P S T D L	V V S W G E N N - N	N S F <mark>V V W</mark> N V P Q	FATDILPNH	F K H N N F <mark>S</mark>	S F V R Q L N T Y	<b>G F</b> R <b>K</b> V	D P D R W <b>E F</b> A N E G <b>F</b> L	RGEKQLLKSIS	R R K	-1
AtHsfA1a	94 P P P F L S K T Y D M V	E D P A T D A	IVSWSPTN-N	N S F I V W D P P E	FSRDLLPKY	F K H N N F S	SFVRQLNTY	G F R K V	D P D R W E F A N E G F L	RGQKHLLKKIS	RRK	
GmHSF33(Class a1)	94 P P P F L S K T Y E M V	EDPSTDS	IVSWSPTN-P	N S F V V W N P P E	FARDLLPKH	F K H N N F S I	SFVRQLNTY	GFRKV	D P D R W E F A N E G F L D D D D W E F A N E C F L	RGQKHLLKTIT	RKK	
SIESIATA(ESF8)	94 P P P F L V K I I D M V		IVSWSPIN-I IVSWSATN	N S F V V W D P P E	FANDLLPNI	F K H N N F S I	SFVKQLNII	····GFKKV	D P D R W E F A N E G F L D P D P W F F A N E G F L	RUQKHLLKSIS	K K K D D V	
Sillisr17(Class a1) BrHsf-29	94 P P P F L S K T Y D M V	D D P A T D S	IVSWSANN-N	N S F I V W D P P O	FAKDLLPKN	FKHNNFS	S F V R O L N T Y	GFRKV	D P D K W E F A N E G F L	RGOKHLLKTIT	RRK	
AtHsfA1d	94 P P P F L S K T Y D M V	D D H N T D S	IVSWSANN - N	N S F I V W K P P E	FARDLLPKNI	FKHNNFS	S F V R O L N T Y	G F R K V	D P D R W E F A N E G F L	RGOKHLLOSIT	RRK	
AtHsfA1d NP 174511.2	94 P P P F L S K T Y D M V	D D H N T D S	IVSWSANN-N	N S F I V W K P P E	FARDLLPKNI	FKHNNFS	S F V R O L N T Y	G F R K V	D P D R W E F A N E G F L	R G O K H L L O S I T	RRK	
BrHsf-24	95 V A P F L R K C Y E M V	D D S S T D S	IISWSTNGDN	N S F V I S D T T V	FSAQLLPKY	F K H S N L <mark>S</mark>	SFIRQLNIY	<b>G F</b> R <b>K</b> V	D A D R C E F A N D W F V	RGQKELLKNVI	RK	
GmHSF10(Class a8)	94 V P P F L K K C Y D M V	Q D C N T D S	VICWSHDG-V	V S F V I S D I T Q	FSVTLLPTY	F K H N N F <mark>S</mark>	<b>S</b> F I R Q L N I Y	<b>G F</b> R <b>K</b> I	D T D S W E F A N E N F V	RGQKHLLKNIH	RK	
StHSFA5	94 P A P F L L K T Y E M V	D D S Q T D D	IVSWTPTG-H	H S F V V W N P P E	FARILLPTY	F K H N N F <mark>S</mark>	S F I R Q L N T Y	<b>G F</b> R <b>K</b> I	D P E R W <b>E F</b> A N E <b>F</b> L	K D Q K H L L K N I H	RK	
GmHSF09(Class a5)	94 P A P F L L K T Y D M V	D D A S T N D	IVSWSSTN-N	N S F V V W N P P E	FARLLLPTY	F K H N N F S	SFIRQLNTY	G F R K I	H P E R W E F A N D E F L	K D Q K H L L K N I Y	RRK	
SHSFA4A	94 L P P F I A K I Y E M V	DDPSTDP	IVSWSLNN-H	K S F I V R N P P D	FARDLLPRY	F K H N N F S I	SFIRQLNTY	GFKK1	D P E Q W E F A N E D F L D D E O W E F A N D D F N	R G Q P H L L K N I Y	RKK	
GmHSF11(Class a4)	04 MV 94 IADEVIKTVNMV		VVSWSIIS-I LIMWGPAN	K S F I V W N P P E	FAKULLPKFI	F K H N N F S I	SFIKULNIY	GFKKV GEPKV	D P E Q W E F A N D D F V D P D P W E F A N E W F I	RGQPHLMKNIH	K K K D D K	
RrHef.23	94 LAPEVVKTYOMV		LITWGPAH.	N S F I V V D P I D	FSORILPAY	F K H N N F S	S F V R O I N T Y	GFRKV	D P D R W E F A N F H F I	RGOKHLLKNIA		
AtHsfB1(HSF4)	94 PAPFLSKTYOLV	DDHSTDD	V V S W N E E G - 1	TAFVVWKTAE	FAKDLLPOY	FKHNNFS	S F I R O L N T Y	G F R K T	V P D K W E F A N D Y F R	RGGEDLLTDIR		
BrHsf-01	94 PAPFLSKTYQLV	D D Q S T D D	VVSWNEDG-S	SAFVVWKTAE	FAKDLLPQYI	F K H N N F S	SFIRQLNTY	<mark>G F R K</mark> T	V P D K W <b>E F</b> A N D N <b>F</b> R	RGQEELLSEIR	RRK	
AtHsfB2a	94 P T P F L T K T F N L V	E D Š S I D D	VISWNEDG-S	SSFIVWNPTD	FAKDLLPKHI	F K H N N F S	SFVRQLNTY	<b>G F K K</b> V	V P D R W <b>E F</b> S N D F <b>F</b> K	RGEKRLLREIQ	RK	
SIHsfB4	94 PAPFLTKTYQLV	D D P S T D H	IVSWGEDD-S	S T F V V W R P P E	FARDLLPNY	F <mark>K H N N F S</mark>	<b>S</b> F V R Q L N T Y	<b>G F R K</b> I	V P D R W <b>E F</b> A N E F <b>F</b> K	R G E K H L L C E I H	R K	
BrHsf-35	94 PTPFLTKTYQLV	D D P V Y D D	LISWNDDG - S	STFIVWRPAE	FARDLLPKY	F K H N N F S	SFVRQLNTY	<b>G F</b> R K V	V P D R W E F S N D C F R	RGEKILLRDIQ	R R K	–II
GmHSF25(Class b1)	94 PAPFLTKTYQLV	E D P G T D E	VISWGESG-N	NTFVVWKHAD	FAKDLLPKYI	F K H N N F S	SFVRQLNTY	G F R K I	V P D K W E F A N É H F K	RGQKELLSEIK	RRK	
BrHst-25 Derthef 11	94 PAPFLTKTYQLV	DDPATDH	V V S W G D D D - 1	I T F I V W R P P E	FARDLLPKY	F K H N N F S F	SFVRQLNTY	GFRKI GEDKI	V P D R W E F A N E F F K	RGEKHLLCEIH	K R K	
DEFISI-11 SIHSE7A	94 PAPEIKIYOLV		VISWNEIG	S I F I V W K A A E T T F V V W K T A E	FAKDLLPKY	F K H N N F S I	SFVRQLNII	GFKKL	V P D K W B P S N D C F K	RGOKELITAID	RRK	
SHSFB-2a-like	95 PAPFLSKTYDLL	EEOEEENSNRNIK	VVSWNGEG - N	NGFVVWCPDE	FSEVMLPKY	F K H N N F S	SFIROLNTY	G F K K V	ASKRWEFHHGKFO	KGCRHLLAEIT		

(C) HSF 單雙子葉 DNA binding domain



doi:10.6342/NTU201703083

-T

-II

圖五、HSF 轉錄因子之 DNA-binding domain (DBD)在植物中胺基酸高度相似性序列。

NLS 為核定位信號區, NES 為核輸出信號區

Figure 5. High similarity sequences of amino acid in HSF DNA binding domain .

NLS indicate unclear localization signal region, and NES indicate nuclear export signal region.

- (A) HSF 轉錄因子之 DNA-binding domain 在單子葉作物中胺基酸高度相似性序列,灰色填色為單子葉作物高度相似性序列,黑色填色 為單子葉作物保守序列,紅色方框為第一大群或第二大群特有之高度相似性序列處。
- (B) HSF 轉錄因子之 DNA-binding domain 在雙子葉植物中胺基酸高度相似性序列,灰色填色為雙子葉植物高度相似性序列,黑色填色為雙子葉植物保守序列,紅色方框為第一大群或第二大群特有之高度相似性序列處。
- (C) HSF 轉錄因子之 DNA-binding domain 在單子葉及雙子葉植物中胺基酸高度相似性序列,綠色填色為第一大群高度相似性序列,藍 色填色為第二大群高度相似性序列,灰色填色為單子葉及雙子葉植物高度相似性序列,黑色填色為單子葉及雙子葉植物保守序列, 紅色方框為第一大群或第二大群特有之高度相似性序列處,黑色箭頭為核苷酸高度相似性序列所在區間。







(C	)HSF 十字花科 DB	HR-A/B domain	IR-A/B NLS	N	ES .						
L											
		HR-A core		Insert	HR-B	-					
AtHsfA1a AtHsfA1b AtHsfA1e BrHsf-29 AtHsfA1d NP 174511.2 AtHsfA1d BrHsf-23 BrHsf-24 BrHsf-25 AtHsfB1 BrHsf-01 AtHsfB2a BrHsf-11 BrHsf-11 BrHsf-11 BrHsf-11 BrHsf-15		L     K     R     D     K     N     V     L     M     Q     E       L     K     R     D     K     N     V     L     M     Q     E       L     K     R     D     K     N     V     L     M     Q     E     L       L     Q     R     D     K     N     V     L     M     Q     E     L       L     K     R     D     K     N     V     L     M     Q     E     L       L     K     R     D     K     N     V     L     M     Q     E     L       L     K     R     D     K     N     V     L     M     Q     E     L       L     K     R     D     K     N     V     L     M     Q     E     L       L     K     R     D     K     N     N     V     L     M     Q     E     L       L     K     G     D     K     K     A     L     A     Q     E     L       L     K     R     S     N     T     V <th>V       K       L       R       Q       Q       Q       T       T       D       1         V       R       L       R       Q       Q       Q       A       T       E       1         V       R       L       R       Q       Q       Q       Q       A       T       E       1         V       R       L       R       Q       Q       Q       Q       V       T       E       1         V       R       L       R       Q       Q       Q       Q       S       T       D       1</th> <th>N       K       L       Q       V       L       V       K       H       L       Q       V       M       E         N       Q       L       Q       N       V       G       Q       K       V       Q       V       M       E         N       Q       L       Q       N       V       G       Q       K       V       Q       V       M       E         H       H       L       Q       N       V       G       Q       K       V       H       V       M       E         N       Q       L       Q       T       M       V       Q       R       L       Q       G       M       E         N       Q       L       Q       T       M       V       Q       R       L       Q       G       M       E         V       Q       T       M       V       Q       R       L       Q       G       M       E         L       E       M       N       Q       R       I       E       A       T       E         L       E       N</th> <th>Q       R       Q       Q       Q       I       M       S       F       L       A       K       A       V         Q       R       Q       Q       Q       M       M       S       F       L       A       K       A       V         Q       R       Q       Q       Q       M       M       S       F       L       A       K       A       V         Q       R       Q       Q       Q       M       M       S       F       L       A       K       A       V         N       R       Q       Q       Q       L       M       S       F       L       A       K       A       V         N       R       Q       Q       Q       L       M       S       F       L       A       K       A       V         N       R       Q       Q       Q       L       M       S       F       L       A       K       A       V         N       R       Q       Q       L       M       M       S       F       L       N       N       M</th> <th>Q N P T · · · F L S Q Q S P G · · · F L N Q Q S P G · · · F L N Q Q S P H · · · F L N Q Q S P H · · · F L S Q Q S P H · · · F L S Q Q S P H · · · · F L S Q Q S P H · · · · F L S Q Q S P H · · · · F L S Q Q S P H · · · · F L S Q Q S P H · · · · F L S Q Q N P S · · · · F L V Q Q P P P P P L D Y Y N N · · · · · · · F L K P A Q P M E · · · · F L · · K P L D · · · · L M P ·</th>	V       K       L       R       Q       Q       Q       T       T       D       1         V       R       L       R       Q       Q       Q       A       T       E       1         V       R       L       R       Q       Q       Q       Q       A       T       E       1         V       R       L       R       Q       Q       Q       Q       V       T       E       1         V       R       L       R       Q       Q       Q       Q       S       T       D       1	N       K       L       Q       V       L       V       K       H       L       Q       V       M       E         N       Q       L       Q       N       V       G       Q       K       V       Q       V       M       E         N       Q       L       Q       N       V       G       Q       K       V       Q       V       M       E         H       H       L       Q       N       V       G       Q       K       V       H       V       M       E         N       Q       L       Q       T       M       V       Q       R       L       Q       G       M       E         N       Q       L       Q       T       M       V       Q       R       L       Q       G       M       E         V       Q       T       M       V       Q       R       L       Q       G       M       E         L       E       M       N       Q       R       I       E       A       T       E         L       E       N	Q       R       Q       Q       Q       I       M       S       F       L       A       K       A       V         Q       R       Q       Q       Q       M       M       S       F       L       A       K       A       V         Q       R       Q       Q       Q       M       M       S       F       L       A       K       A       V         Q       R       Q       Q       Q       M       M       S       F       L       A       K       A       V         N       R       Q       Q       Q       L       M       S       F       L       A       K       A       V         N       R       Q       Q       Q       L       M       S       F       L       A       K       A       V         N       R       Q       Q       Q       L       M       S       F       L       A       K       A       V         N       R       Q       Q       L       M       M       S       F       L       N       N       M	Q N P T · · · F L S Q Q S P G · · · F L N Q Q S P G · · · F L N Q Q S P H · · · F L N Q Q S P H · · · F L S Q Q S P H · · · F L S Q Q S P H · · · · F L S Q Q S P H · · · · F L S Q Q S P H · · · · F L S Q Q S P H · · · · F L S Q Q S P H · · · · F L S Q Q N P S · · · · F L V Q Q P P P P P L D Y Y N N · · · · · · · F L K P A Q P M E · · · · F L · · K P L D · · · · L M P ·					
AtHSFA2 AtHSFA2 NP 001118388.1 BrHsf-10 BrHsf-20 BrHsf-16 BrHsf-15	$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	L K R D H G V L V A E V L K R D H G V L V A E V L K R D H S V L V A E V L K R D H S V L V A E V L K R D H S V L V A E V L K R D K Q V L V M E L L R K E K Q L L M E L	V       R       L       R       Q       Q       H       S       S       K       S         V       R       L       R       Q       Q       H       S       S       K       S         V       R       L       R       Q       Q       Q       H       S       S       K       S         V       R       L       R       Q       Q       Q       H       N       S       K       S         V       K       L       R       Q       Q       Q       Q       S       T       K       Y         A       S       L       R       Q       Q       Q       Q       T       A       R       I         V       S       L       R       Q       Q       Q       E       T       N       K       S	5       Q       V       A       M       E       Q       R       L       L       V       T       E         5       Q       V       A       M       E       Q       R       L       L       V       T       E         5       Q       V       A       A       M       E       Q       R       L       L       V       T       E         6       Q       V       A       M       E       Q       R       L       L       V       T       E         6       Q       V       A       E       M       E       Q       R       L       L       V       T       E         7       Y       L       K       L       I       E       E       K       L       K       T       E         7       Y       L       K       S       M       E       Q       R       I       E       G       A       E         7       Y       L       K       S       M       E       Q       R       I       E       G       A       E         8       Y	X       R       Q       Q       M       M       T       F       L       A       K       A       L         K       R       Q       Q       M       M       T       F       L       A       K       A       L         K       R       Q       Q       M       M       T       F       L       A       K       A       L         K       R       Q       Q       M       M       T       F       L       A       K       A       L         S       K       Q       Q       M       M       T       F       L       A       K       A       L         S       K       Q       Q       M       M       T       F       L       A       K       A       L         K       K       Q       Q       M       M       S       F       L       A       R       A         K       K       Q       R       M       M       S       F       L       A       R       M	$ \begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$					

### (D) HSF 雙子葉 HR-A/B domain

		DBD	HR-	A/B NLS	NES	
					X-13-3	X
						1 1930
		/				S S
					"要,學	
			HR-A core	Insert	HR-B	
AtHSFA2 NP 001118388.1	75 C V E V G Q Y G	F D G E V E R L K	R D H G V L V A E V V R L F	RQQQHSSKSQVAAMEQR	L L V T E K R Q Q Q M M T F L A K A L N	- N P N F V Q Q F
AtHSFA2	75 C V E V G Q Y G	FDGEVERLK	R D H G V L V A E V V R L F	R Q Q Q H S S K S Q V A A M E Q R	L L V T E K R Q Q Q M M T F L A K A L N	- N P N F V Q Q F
BrHst-10 CmHSE34(Close o2)	75 C V E V G Q Y G	FEGEVEKLK	RDHSVL VAEVVKLP	R Q Q Q H N S K S Q V A E M E Q R	LLVIEKKQQQMMIFLAKALN	- NPNFVQQF
GmHSF08(Class a2)	75 C V E L G E F G	LEGEMERLR	RDRTVL - MAEIVRL	ROOOHN S REOLLSMETR	LOATEKKHOOMMNFLAKALN	- NOAFIOOF
SIHsf30	75 C I E I G Y Y G	MEEELERLK	R D K N V L M T E I V K L F	RQQQQSTRNHIIAMGEK	I E T Q E R K Q V Q M M S F L A K I F S	- N P T F L Q Q Y
StHSF30(Class a2)	75 C I E I G Y Y G	M E E E L E R L K	R D K N V L M T E I V K L F	R Q Q Q Q S T R N Q I I A M G E K	I E R Q E R K Q E Q M M S F L A K I F S	- N P T F L Q Q Y
SlHsfA6B Brillof 20	75 Y I E L G K L E	IDG EIDRLR	REKKDL MMELVELF	K Q H Q Q T T K S H I K S M E E K	L K R T E A K Q Q Q M M N F L A K A M Q	- N P R F L E Q M
BrHsf-16	63 C V E		KEKOLL LMELASLE	R O O O O T A R I Y I K S M E O R	L E G A E K K O R M M M S F L A R A F O	- GPTFLYOL
BrHsf-15	63 C V E	L R	KEKQLL - LMELVSLF	R Q Q Q E T N K S Y I R A M E Q R	I E G A E R K Q R K M M S F L A R A M Q	- S P S F L H Q L
StHSFA3	74 S A E A G K - G	T M D E I E K L R	NEKSLM MQEVVELO	QQQRGTVQQMESVNEK	L Q A A E Q R Q K Q M V S F L A K V L Q	- N P T F L A R V
SIHSFA3	74 S A E A G K - G	T M D E I E K L R	NEKSLM MQEVVELO	Q Q Q Q R G T V Q Q M E S V N E K	L Q A A E Q R Q K Q M V S F L A K V L Q	- N P T F L A R V
AtHsfAle AtHefAlb(HSF3)	75 C V E V G K F G	LEEEVERLQ	RDKNVL MQELVRLP	R Q Q Q Q V T E H H L Q N V G Q K	V H V M E Q R Q Q Q M M S F L A K A V Q	- SPGFLNQF SPGFLNOI
GmHSF04(Class a1)	75 C V E V G K F G	LEE EVERLK	RDKNVL MOELVRL	ROKOOGTDNOLONVGOR	V O S M E O R O O O M M S F L A K A M O	- SPGFLAOF -I
AtHsfA1a	75 C V E V G K F G	LEEEVEQLK	R D K N V L M Q E L V K L F	R Q Q Q Q T T D N K L Q V L V K H	L Q V M E Q R Q Q Q I M S F L A K A V Q	- N P T F L S Q F
GmHSF33(Class a1)	75 C V E V G K F G	L E E E V E I L K	R D K N V L M Q E L V R L F	R Q Q Q Q A T D N Q L Q S M V Q R	L Q G M E Q R Q Q Q M M S F L A K A V Q	- S P G F L A Q F
SIHsfAla(HSF8)	75 C V E V G K F G	LEEEVERLK	RDKNVL MQELVRLF	R Q Q Q Q A T D N Q L Q G M V Q R	L Q G M E L R Q Q Q M M S F L A K A V N	- R P G F L A Q F
BrHsf-29	75 C V E V G K F G	LKE EVERLK	RDKNVL MQELVRLF	R O O O O S T D N O L O T M V O R	L O G M E N R O O O L M S F L A K A V O	- SPHFLSOF
AtHsfA1d	75 C V E V G K F G	LEEEVERLK	R D K N V L M Q E L V R L F	RQQQQSTDNQLQTMVQR	L Q G M E N R Q Q Q L M S F L A K A V Q	- SPHFLSQF
AtHsfA1d NP 174511.2	75 C V E V G K F G	L E E E V E R L K	R D K N V L M Q E L V R L F	R Q Q Q Q S T D N Q L Q T M V Q R	L Q G M E N R Q Q Q L M S F L A K A V Q	- S P H F L S Q F
BrHsf-24	75 E E K S G E S E	LWK EVDILK	G D K K A L A Q E L V K V H	R Q Y Q E S T D T K M L H L E D R	V Q G M E E S Q Q E M L S F L V M V M Q	- N P S L L V Q L
GmHSF10(Class að) StHSFA5	75 T V D P E R A A	FEEEIDKLT	REKSGL EANVSREE	R O O O S A A K L O L E E L T G R	V G S I E O R O E S L L A F V E K A I O	- SPGFMVQL - NPDFVERL
GmHSF09(Class a5)	75 L V D P E R A A	FEEEIDKLS	REKTSL ESNIYNFF	X Q H Q S T A K P K L E D F L Q R	L D G I E Q R Q K Q L L N F F E K A L Q	- N P T F V E H L
SIHSFA4A	75 L T E S E R Q G	Y K E D I E K L K	HENESL HLVLHRH	K Q D H Q G L E M Q M Q V L N Q R	V Q Q V K D R Q K N V L S T L A R T I N	- K P G L A L S L
GmHSF11(Class a4)	75 I G E A E R Q S	FTDEIEKLK	H D K E Q L L V E L Q K Y (	Q H E W Q A Y E I Q M H S S K D R	L E K L E Q N Q Q K M V S S V S H V L Q	- K P V I S V N I
GmHSF10(Class C1) BrHsf-23	73 N F N L H S H H	MMD KVEELD	VEDGELVKELERIE	R D F O R F L F L F L O R M N O R	LEIIEKKPQQMMAFLSKVVE	- DPQVLSKI
AtHsfB1(HSF4)	76 S E S N S G G	G D D H G S S S T S S P G S S	KNPGSV ENMVADLS	S G E N E K L K R E N N N L S S E	LAAAKKQRDELVTFLTGHLKV	- R P E Q I D K M
BrHsf-01	77 SESNSAGDDHG	S S S T S S P G S	KHPGSV ENMVADLS	S G E N E K L K R E N S S L S S E	LAAAKRQRDELVAFLTEQMKV	- GPEQIDQM
AtHsfB2a	64 Q VM S S S P S	S W Y C H Q T K T	T G N G G L S V E L I	LEENEKLRSQNIQLNRE	L T Q M K S I C D N I Y S L M S N Y V G	
SIHstB4 BrHef-35	77 D S D D Q L Y Q	Q Q N I N W C D S P C S N N N G G O V G V V I O	NASNNN TNTVTALS	S E D N D R L R R S N N M L M S E	LAHMKKLYNDIIYFVQNHVKPVT ITKIKGIXSNIXTIMSNETS	PSSSYNTCS GOTDCA
GmHSF25(Class b1)	77 C D D A G S T S	T S S S S G S K	NOGSVETNTTPSHOLS	S S E N E K L K K D N E T L S C E	LARARKOCDELVAFLRDRLMV	- GPDOIDRI
BrHsf-25	77 R V D A A A A S	MDERYWCESPPPRPR	AIPTTV DAQVTAL	Γ E D N E R L R R S N T V L M S E	LAHMKKLYNDIIYFVQNHVKPVA	PSNSYLPSF
BrHsf-11	67 S S P A G T G G	G G G S V G - V A	LQRTTS CTTAPELM	A E E N E R L R K E N V Q L S Q E	L T K L K G L Y S N I Y K L M S N F T S	
SIHSF24 SIHSFB-20-liko	78 G D D I G S S S	T S S P D S K N P	GSVDTPGKLSQFTDLS	S D E N E K L K K D N Q M L S S E	L V Q A K K Q C N E L V A F L S Q Y V K V	- APDMINRI
7111.71°D=2211KC				A DE DE DE VERTE DE V		



doi:10.6342/NTU201703083

圖六、HSF 轉錄因子之 HR-A/B Domain 在植物中胺基酸高度相似性序列

NLS 為核定位信號區, NES 為核輸出信號區

Figure 6. High similarity sequences of amino acid in HSF HR-A/B domain.

NLS indicate unclear localization signal region, and NES indicate nuclear export signal region.

- (A) HSF 轉錄因子之 HR-A/B Domain 在單子葉作物中胺基酸高度相似性序列,灰色填色為單子葉作物高度相似性序列,紅色方框為第 一大群或第二大群特有之高度相似性序列處。
- (B) HSF 轉錄因子之 HR-A/B Domain 在茄科作物中胺基酸高度相似性序列,灰色填色為茄科作物高度相似性序列,紅色方框為第一大群或第二大群特有之高度相似性序列處。
- (C) HSF 轉錄因子之 HR-A/B Domain 在十字花科植物中胺基酸高度相似性序列,灰色填色為十字花科植物高度相似性序列,黑色填色 為十字花科植物保守序列,紅色方框為第一大群或第二大群特有之高度相似性序列處。
- (D) HSF 轉錄因子之 HR-A/B Domain 在雙子葉植物中胺基酸高度相似性序列,灰色填色為雙子葉植物高度相似性序列,紅色方框為第 一大群或第二大群特有之高度相似性序列處。
- (E) HSF 轉錄因子之 HR-A/B Domain 在單子葉及雙子葉植物中胺基酸高度相似性序列,綠色填色為第一大群高度相似性序列,藍色填色為第二大群高度相似性序列,灰色填色為單子葉及雙子葉植物高度相似性序列,紅色方框為第一大群或第二大群特有之高度相似性序列處。







圖七、WRKY 轉錄因子之 DNA-binding domain (DBD)在植物中胺基酸高度相似性序列

Figure 7. High similarity sequences of amino acid in WRKY DNA-binding domain.

- (A) WRKY 轉錄因子之 DNA-binding domain 在單子葉作物中胺基酸高度相似性,灰色填色為單子葉作物高度相似性序列,黑色填色為 單子葉作物保守序列,紅色方框為第一大群或第二大群特有之高度相似性序列處。
- (B) WRKY 轉錄因子之 DNA-binding domain 在單子葉及雙子葉植物中胺基酸高度相似性序列,藍色填色為第一大群高度相似性序列, 綠色填色為第二大群高度相似性序列,灰色填色為單子葉及雙子葉植物中高度相似性序列,黑色填色為單子葉及雙子葉植物保守序 列,紅色方框為第一大群或第二大群特有之高度相似性序列處,黑色箭頭為核苷酸高度相似性序列所在區間,綠色星星表示在低溫、 鹽害及乾旱逆境下表現之轉錄因子。
doi:10.6342/NTU201703083

(A) DREB/CBF 單子葉作物



Ĩ

**AP2 Domain** 

			1
			1
ZmDREB2A homology 1	90 K A P A K G S K K G C M K G K G G P D N T Q G	G Y R G V R Q R T W G K W V A E I R E P N R V - D R L W L G T F P T A E D A A R A Y D E A A R A M Y G D L - A R T N F P	G Q D A T T S A Q
ZmDREB2A homology 3	90 K A P A K G S K K G C M K G K G G P D N T Q G	G Y R G V R Q R T W G K W V A E I R E P N R V - D R L W L G T F P T A E D A A R A Y D E A A R A M Y G D L - A R T N F P	G Q D A T T S A Q
ZmDREB2A homology X1	90 K A P A K G S K K G C M K G K G G P D N T Q G	G Y R G V R Q R T W G K W V A E I R E P N R V - D R L W L G T F P T A E D A A R A Y D E A A R A M Y G D L - A R T N F P	G Q D A T T S A Q
ZmDREB2A homology X2	90 K A P A K G S K K G C M K G K G G P D N T Q G	G Y R G V R Q R T W G K W V A E I R E P N R V - D R L W L G T F P T A E D A A R A Y D E A A R A M Y G D L - A R T N F P	GQDATTSAQ 🗡 I
ZmDREB2A homology 2	<sup>79</sup>	G Y R G V R Q R T W G K W V A E I R E P N R V - D R L W L G T F P T A E D A A R A Y D E A A R A M Y G D L - A R T N F P	G Q D A T T S A Q
ZmDREB2A homology X3	<sup>79</sup>	G Y R G V R Q R T W G K W V A E I R E P N R V - D R L W L G T F P T A E D A A R A Y D E A A R A M Y G D L - A R T N F P	G Q D A T T S A Q
TaDREB2	91 KRNGGGKR KRAAAADEEPAPAAAAA	. S Y R G V R M R A W G K W V S E I R E P R K K - S R I W L G T F P C P E MA A R A H D A A A L S I K G A R - A V L N F P	DLAPALPRP
OsDREB1B	86 K R P A G R T K F R E T R H P V	- Y R G V R R R G G R P G A A G R W V C E V R V P G A R G S R L W L G T F A T A E A A A R A H D A A A L A L R G R A - A C L N F A	DFAWRMP - P
OsDREB1A	86 K R P A G R T K F R E T R H P V	- F R G V R R G N A G R W V C E V R V P G R R G C R L W L G T F D T A E G A A R A H D A A M L A I N A G G G G G G A C C L N F A	. D S A W L L A V P
Zea mays ZmDREB1A	85 K R P A G R T K F R E T R H P V	- F R G V R R G A A G R W V C E V R V P G R R G A R L W L G T Y L A A E A A A R A H D A A I L A L Q G R G A G R L N F P	DSARLLAVP – I
TaDREB3	83 K R P A G R T K F R E T R H P L	- Y R G V R R G A A G R W V C E V R Q P N K K - S R I W L G T F A T P E A A A R A H D V A A L A L R G R A - A C L N F A	. D S A T L L A V D
LpCBF3	84 K R P A G R T K F R E T R H P V	- YRGVRRRG NA GRW VCEVRVPGRRGSRLWVGTFDTAEI AARAHDAAMLALA AGD-VCLNFA	DSAELLDMP





	(C) DREB/CBF 雙子葉植物 	DREB2/ERF	CBF/DREB2/ERF subfamily	
		AP2	Domain	
AtDREB1A GmDREB1A-2 GmDREB1B-1 GmDREB1C-1 GmDREB1B-1 GmDREB1F-1 GmDREB1F-1 GmDREB1H-1 LIDREB1A CaCBF1A PnDREB1 AhERF6 AhERF4 AhERF5 DcDREB-A6	81       A       G       -       -       R       K       -       K       F       R       -       F       T       R       R       N       S       K       F       R       -       -       F       T       R       N       S       K       W       R       N       S       K       W       R       N       S       K       W       N	C E V R E P N K K T - R I WL G T S E V R E P N K K T - R I WL G T C E V R E P N K K S - R I WL G T C E M V P N N N S - R I WL G T C E V R V P N D K S T R I WL G T C E V R E P N K K S - R I WL G T C E L R Q P N N K N A R V WL G T C E L R Q P N N K N A R V WL G T C E V R E P N K K S - R I WL G T C E V R E P N K K S - R I WL G T C E V R E P N K K S - R I WL G T C E V R E P N K K S - R I WL G T C E V R E P N K K S - R I WL G T C E V R E P N K K T - R I WL G T S E I R E P N R G S - R L WL G T A E I R D P R K G V - R V WL G T S E I R L P K N R T - R L WL G T	`F Q T A E MAAARAH D VAALALR         `F P T P E MAARAH D VAAIALR         `F P T A E MAARAH D VAAIALR         `Y P T P E MAARAH D VAALALR         `Y P T P E MAARAH D VAVLALK         `Y P T P E MAARAH A RAH D VAVLALK         `Y P T P E MAARARAH D VAALALR         `Y P T P E MAARARAH D VAALALR         `Y P T A E MAARARAH D VAALALR         `Y P T A E MAARARAH D VAALALR         `Y P T A E A A RAH D VAALALR         `Y T A E E A A LAY D VAALALR         `Y T A E E A A LAY D KAAFK         `Y A E E A A LAY D KAAFK	G R S A C L N F A D S A WR L R - I P E S G R Y A C L N F A D S T WR L P - I P A T G R S A C L N F A D S A S R L P - VP A T G K S A C L N F A D S A S R L P - VP A T G K S A C L N F A D S A WR L T - VP A T G K S A C L N F A D S A WR L P - L P A S G T S A L F N F P D S V S L L P - VA K S G T S A N F N F P D S V S L L P - VA K S G T S A I L N F P HA A T S L P - R L N S G T S A L N F P HA A T S L P - I A N S G R S A C L N F A D S A WR L K - I P E S G R S A C L N F A D S A WR L K - I P E S G R S A C L N F A D S V WR L P - VP V S G S S A R L N F P HI T D Y S S - I K G S G K K A K V N F P N E D D E Y S - I Q S G D F A K L N F P HL K + H H G S C I L G G G G D F A R L N F P HL K L D Q E

# C) DBED/CDE 雌マ並はい



### (D) DREB/CBF 單雙子葉植物

CaCBF1A

PnDREB1

LpCBF3

TaDREB2

AhERF5

DREB-A6

AhERF4

AhERF6



圖八、DREB/CBF 轉錄因子之 DNA-binding domain (DBD)在植物中胺基酸保守序列

Figure 8. High similarity sequences of amino acid in DREB/CBF DNA-binding domain .

- (A) DREB/CBF 轉錄因子之 DNA-binding domain 在單子葉作物中胺基酸高度相似性序列,灰色填色為單子葉作物高度相似性序列,黑 色填色為單子葉作物保守序列,紅色方框為第一大群或第二大群特有之高度相似性序列處。
- (B) DREB/CBF 轉錄因子之 DNA-binding domain 在豆科作物中胺基酸高度相似性序列,灰色填色為豆科作物高度相似性序列,黑色填色為豆科作物保守序列,紅色方框為第一大群或第二大群特有之高度相似性序列處。
- (C) DREB/CBF 轉錄因子之 DNA-binding domain 在雙子葉植物中胺基酸高度相似性序列,灰色填色為雙子葉植物高度相似性序列,黑 色填色為雙子葉植物保守序列,紅色方框為第一大群或第二大群特有之高度相似性序列處。
- (D) DREB/CBF 轉錄因子之 DNA-binding domain 在單子葉及雙子葉植物中胺基酸高度相似性序列,綠色填色為第一大群高度相似性序列,藍色填色為第二大群高度相似性序列,灰色填色為單子葉及雙子葉植物高度相似性序列,黑色填色為單子葉及雙子葉植物保守序列,紅色方框為第一大群或第二大群特有之高度相似性序列處,黑色箭頭為核苷酸高度相似性序列所在區間。

(A) COR15 基因 雙子葉植物

																																					179	0	1.0	5	1-				
	1	2	3	4	5 6	7	8	9	10 1	1 12	2 13	14	15	16	17 1	8 19	9 20	) 21	22	23	24	25 2	6 27	28	29	30	31	32 3	33 3	34 35	36	37	38 39	9 40	41	42	43 4	4 45	46	47	48 4	49 50			
AtCor15A NP 001189733.1	M	A -	S	-	S		- F	-	Н	S	G		А	-	-	-	K	-		Q	-	S	-	-	s -	F		G	А	V	· 1	R V	G	-	Q-	K	Т	Q	F	V	V V	S	٦	•	
AtCor15A	M	Α-	S	-	S		- F	-	Н	S	G		А			-	K	-		Q		S	-	-	S -	F	- 7	G	А	V	· 1	x v	G	-	Q-	K	Т	Q	F 1	V	V V	S		I	
BnCor15A homology X1	M	A N	1 S	F	S	G ·	- A	V	L	S	G	IN	N S	S	F	Р	S	G	V A	A K	Q	S	G	V	A I	K Q	Q S	G	-	V	G	A V	G	F	G I	R K	Т	E	F 1	V	V V	А			
BnCor15B homology X2	M	A N	1 S	L	S	G	S A	V	L	S	G	Ι-	G	-	S	-	S	-	F-	S	-	S	G	A	A I	K Q	Q S	G	-	V	G	A V	G	F	G I	R K	Т	Е	F	V	V V	А		тт	
CbCor15A	M	A N	1 S	F	S	G.	- A	V	L	Т	G	М -	G	-	S	-	S	-	F-	H	-	S	G	-	Τŀ	K Q	Q S	S	-	Ι	G	A V	G	V	S I	R K	Т	Q	F I	L	V V	А		11	
CsCor15A	M.	A N	1 S	F	S	G	- A	V	L	Т	G	М -	G	-	S	-	S	-	F-	· H	-	S	G	-	A I	Kζ	Q S	G	-	Ι	S S	S V	G	V	S (	Q K	Т	Q	F	V	V V	А			
	51	52	53	54 5	5 56	57	58	59	60 6	61 62	2 63	64	65	66	67 6	8 69	9 70	) 71	72	73	74	75 7	6 77	78	79	80	81	82 8	83 8	34 85	86	87	88 89	90	91	92	93 9	4 95	96	97	98 ș	19 100			
AtCor15A NP 001189733.1	Q	R K	K	S	L	Ι	Y A	А	K	G	D	G N	I	L	D	D	L	N	Εı	A T	K	Κ	А	S	DH	FΝ	VT	D	Κ	Т	K	E A	L	А	D	ЗE	K	A	K	D	Y V	V	٦	-	
AtCor15A	Q	R K	K	S	L	Ι	Y A	А	K	G	D	G N	I	L	D	D	L	N	Εı	A T	K	Κ	А	S	DH	FΝ	V T	D	Κ	Т	K	E A	L	А	D	ЗE	K	A	K	D	Y V	V		I	
BnCor15A homology X1	Q	R K	K	S	L	Ι	Y A	D	K	G	D	G N	I	L	D	D	L	N	E /	A T	K	R	А	S	D	Y A	A T	Е	Κ	Т	N	E A	L	Κ	H	ЭE	Е	A	K	D	Y V	V			
BnCor15B homology X2	Q	R K	K	S	L	Ι	Y A	D	K	G	D	G N	I I	L	D	D	L	N	E /	A T	K	R	А	S	D	Y A	A T	Е	Κ	Т	N	E A	L	K	H	ЭE	Е	А	K	D	Y V	V		п	
CbCor15A	Q	R K	K	S	L	V	Y A	А	K	G	D	G N	I I	L	D	D	L	N	E /	A T	K	Κ	А	S	DH	FΝ	V T	D	K	Т	K	E A	L	А	D	ЭE	K	A	K	D	Y V	V		11	
CsCor15A	Q	R K	K K	S	L	V	Y A	А	K	G	D	G N	I I	L	D	D	L	N	E /	A T	K	Κ	А	S	D	FΝ	V T	D	K	Т	K	E A	L	А	D	ЭE	K	A	K	D	Y V	V			
	101	102	103 10	04 10	5 106	107	108	109 1	10 11	1 112	2 113	114	115 1	16 1	17_11	8 119	9_120	) 121	122	123 1	24 1	25 12	6 127	128	129	130	131 1	32 13	33 13	34 135	136	137 1	38 139	9 140	141	142 1	43 14	4 145	146	147	148 14	9 150	151		
AtCor15A NP 001189733.1	- ]	E	K	-	N	- 1	K A	- 1	А	-	-	N -	K	-	А	-	А		E	· F	-	А	-	Е	- (	G -	K	-	А	· .	G -	E	·	А	- I	Κ-	D	-	Α.	- 7	ſ -	Κ		1.	-
AtCor15A	E I	K N	S	Е	Т	A I	D T	L	G	-	K	E A	A E	K	А	А	А	Y	V I	E E	K	G	K	Е	A A	A -	N	K	А	А	E I	F A	Е	G	K A	A G	Е	А	K J	D /	A T	K		! <sup>_</sup> _	I
BnCor15A homology X1	D	K N	V	Е	D	K	D T	· -	А	V	D	E A	A Q	K	А	L	D	Y	V	K A	K	G	N	Е	A (	G -	N	K	V	А	E I	7 V	Е	G	K A	A G	Е	А	K J	D /	A T	K	A -	٦	
BnCor15B homology X2	D	K N	V	Е	D	K	D T	· -	А	V	D	E A	A Q	K	А	L	D	Y	V	K A	K	G	N	Е	A (	G -	N	K	V	А	E I	7 V	Е	G	K A	A G	Е	А	K J	D /	A T	K	А	L	ſΤ
CbCor15A	E I	K T	S	Е	N	N I	DT	L	А	-	K	E A	A E	K	А	А	А	Y	V	E E	K	G	K	Е	A	A -	N	S	А	А	DI	A	Е	G	K A	A G	Е	А	K J	D /	A T	K	-		.1
CsCor15A	E I	K T	S	Е	Ν	ΤI	D T	L	Т	-	K	E A	A E	Κ	A	А	А	Y	V	E E	Κ	G	Κ	Е	- (	G A	A N	K	А	А	E I	A	Е	G	K	A G	D	A	K J	D /	A T	Κ		J	

N. N. N.

子 譜

(B) COR15 單雙子葉植物

								•																									10 -	7		X				
								,																									9 A.		2VI	0	1 EI			
	1 1	23	4	5 6	7	8 9	10	11 1	2 13	14 1	15 16	17	18 19	9 20	21 2	2 23	24 2	25 26	27 2	28 29	30 31	32	33 34	35	36 37	38 3	9 40	41 42	2 43 4	44 45	46 47	7 48	49 50	) 51	52 53	54 5	5 56 5	7 58	59 60	
AtCor15A NP 001189733.1	M A	-	5 -	S		F	- H	I S	G	- A	-	К -	-	Q -	S		-	S		- F	- 1	- G	A	V -	R	V G	- Ç	) -	K T	Q	FV	V V	S	Q R	K	K S	L I	Y A	A A	
AtCor15A	M A		S -	S		F	- H	I S	G	- A	-	К-	-	Q -	S		-	S		- F	- 1	- G	A	V -	R	V G	- Q	) -	К Т	Q	F V	V V	S	Q R	K	K S	L I	Y A	A A	
BnCor15A homology X1	M A	М	S F	S	G-	А	V L	S	G	I N	S	S F	Р	s c	V	A I	K Q	S	G V	A K	K Q	S G	÷ -	V G	A	V G	FΟ	R	К Т	Е	F V	V V	А	QR	K	K S	LI	Y A	D	LT
BnCor15B homology X2	M A	М	S L	S	G S	А	V L	S	G	I G	S	S F	-	S -	S	- (		А	A K	- (	) -	S G	÷ -	V G	A	V G	FC	R	К Т	Е	F V	v v	А	0 F	K	K S	LI	Y A	D	
CbCor15A	MA	м	S F	S	G-	А	V L	Т	G	MG	s	S F	-	н -	s	- (	- F	Т	- к	- (	) -	s s		IG	A	V G	v s	R	к т	0	F L	v v	А	O R	к	K S	LV	ΥA	AA	
CsCsCor15A	ΜA	м	S F	S	G.	Δ	V L	Т	G	MG	S	S F	-	н.	s	- (	- 7 -	Δ	- K	- (	) -	S G	-	IS	S	V G	V S	0	кт	0	E V	v v	Α		ĸ	KS	L V	Y A	AA	
Wear15	MA		2	ç	c -	V	т т	· 1	G	M 0	5	s I		т	<u>م</u>		A T	т	ст	- 0	2			v		<u>т с</u>	р 5	V D		Y				× ř	D	D T	V	1 /1 S		Γ-Π
WC0115	61 6	2 63	64	0 65 66	67	68 69	70	71 7	12 73	74	- 76	77	78 70	9 80	81 8	2 83	ч L 84 8	35 86	87 8	- 1	90 91	92	93 94	к - 95	96 97	08 9	9 100 ·	к 101 102	2 103 10	- 105	106 100	7 108 1	109 110	) 111	112 112	к і 3 114 11	- v	7 118	119 120	_ 11
AtCor15A NP 001189733.1	K G	D 05	G N	I	. , T	D	DI	N	<b>2</b> / 3	F .	Δ	Π.	ĸ	, 00 K				F	V T	D K		т	K	F	Δ	ΙΔ		E	- K	Δ	K D	V V	V			F -	K -	- N	J	_
AtCor15A	K G	D		ī	T	D		N			1	T	v					r v	V T		7	т	v	E				E	V			v v	v	T	,	V N	C E	Т		
DnCor15A homology V1	K U	D	J N C N	1	- L	D				-	A	- 1 T	K	- 1		A		r v			· ·	1 - T	N						- K	A			v v	- b	, - \			- 1		
DIICOTISA HOHIOIOgy AI	K G	D	JN	1	- L	D	DL	/ N	-	E -	A	I -	ĸ	- K	-	A		Y	A I		-	1 -	N	- E	A	LK	нс		- E	A	K D	Y V	V	- D	) -	K N	V E	- D	) K	$\geq I$
BILOFISB NOMOLOgy A2	K G	D	jΝ	1	- L	D	DL	N		Е -	A	T -	K	- K	-	A	5 D	Y	A I	EK	-	Т-	N	- E	A	LK	H C	E	- E	A	K D	Y V	V	- D	) -	K N	VE	- D	) К	
CbCor15A	K G	D	G N	Ι	- L	D	DL	. N	- 1	E -	A	T -	K	- K	-	A S	5 D	F	V T	DK	-	T -	K	- E	A	L A	DC	E	- K	A	K D	Y V	V	- E	i -	K T	S E	- N	N N	
CsCsCor15A	K G	D	G N	Ι	- L	D	D L	. N	- [	Е -	А	T -	Κ	- K	-	A S	S D	F	V T	DK	-	Τ-	Κ	- E	A	L A	DC	E	- K	А	KD	Y V	V	- E	- 1	K T	S E	- N	I T	
Wcor15	- G	- ]	R -	L	C L	-	Q -	Ν	A I	P R	А	T P	А	Y N	D	A	A D	-	A T	D k	А	I D	) G	V K	G	V A	D -	Е	L K	-	KG	- V	А	E A	۱ A	E A	V S	G N	J T	_ <del>_</del>
	121 12	2 123	124 1	25 126	127 1	28 129	130	131 13	32 133	134 13	35 136	137 1	38 139	9 140	141 14	2 143	144 14	45 146	147 14	8 149	150 151	152 1	153 154	155 1	156 157	158 15	9 160	161 162	2 163 1	64 165	166 167	7 168 1	69 170	171 1	172 173	174 17	5 176 17	7 178 1	179 180	
AtCor15A NP 001189733.1	K -	A ·	A	-	- N	-	- K	- 1	A	- A	-	E -	F	- A		E -	G	-		К -	А		G	- E		- A		-	К -	-	D -		A		-	Τ -	- K		-	
AtCor15A	D -	T I	G	-	K E	А	- E	K	A	A A	Y	V E	Е	K C	K	E -	A	-	A -	N K	K A	Α -	Е	F A	I	E G	- K	- 1	A <mark>G</mark>	-	E -	A -	K	- D	) -	A T	- K		-	
BnCor15A homology X1	D -	T -	A	V	D E	А	- Q	K	A I	L D	Y	V K	Α	K C	N	E A	A G	- I	N -	К -	V	A -	Е	F V	' -	E G	- K	- 1	A <mark>G</mark>	-	E -	A -	K	- D	) -	A T	- K	- A	A -	LI
BnCor15B homology X2	D -	Т	A	V	D E	А	- Q	K	A	L D	Y	V K	Α	K C	N	E A	A G		N -	К -	V	A -	Е	F V	' - I	E G	- K		A <mark>G</mark>	- 1	Е-	Α -	K	- <b>Г</b>	) -	A T	- K	- A	۰ ۱	ſ
CbCor15A	D -	Т	LA		ΚE	А	- E	К	A	A A	Y	V E	Е	K C	K	E	A		A -	N S	А	Α -	D	F A	1	E G	- K		A G	-	Е-	A -	K	- г		A T	- K		-	
CsCsCor15A	D -	т	ιт		КЕ	А	- E	к	A	A A	Y	V E	Е	кс	К	E -	G		A -	NK	K A	A -	Е	FΑ		E G	- K		A G	-	D -	A -	К	- г	) _	A T	- K		-	
Wcor15	ΕK	A	A		ΕĒ	A	G K	G	A	S E	-	V D	E	KA	K	DI	F G	Е	0 A	Kk	A_	ΤЕ	E	- A	W	DG	AK	D	A A	0	GΙ	ТD	K	V A	A D	A A	КК	E A	A N	ЪΠ
													~				0		×							- 0				×				# : <b></b>				<u> </u>	'	

## 圖九、COR15 基因在植物中胺基酸保守序列

Figure 8. High similarity sequences of amino acid in *COR15* gene.

(A) COR15 基因在雙子葉植物中胺基酸高度相似性序列,灰色填色為雙子葉植物高度相似性序列,黑色填色為雙子葉植物保守序列,,

紅色方框為第二大群特有之高度相似性序列處。

(B) COR15 基因在單子葉及雙子葉植物中胺基酸高度相似性序列,灰色填色為單子葉及雙子葉植物高度相似性序列,黑色填色為單子葉 及雙子葉作物保守序列, 紅色方框為第一大群特有之高度相似性序列處。

XX

(四)親緣關係分析

1. HSF 轉錄因子

依據 HSF 轉錄因子胺基酸序列進行多重序列比較分析,以鄰接法 (neighbor -joining method)產生親緣關係樹狀圖,綜合單子葉及雙子葉作物 HSF 轉錄因子 (圖 十)進行胺基酸多重序列比較分析,並建立親緣關係樹圖,分群結果可分為兩大群, 第一大群可細分為 6 小群,阿拉伯芥之 AtHSFA2 及 ATHSFA2(NP001118388.1), 白菜的 BrHsf-10、 BrHsf-16 及 BrHsf-15, 大豆的 GmHSF34 及 GmHSF08, 番茄 的 SIHSF30,馬鈴薯之 StHSF30 歸為第 1 小群;玉米的 ZmHSF30、ZmHSF30 homology 2 及 ZmHSF13,水稻的 OsHSFA2C、OsHSFA2A 及 OsHSFA2D,番茄的 SIHsfA6B, 白菜的 BrHSF-20 為第2小群; 番茄的 SIHSFA3, 馬鈴薯的 StHSFA3, 玉米的 ZmHSF6、ZmHSF12-P1 及 ZmHSF12-P2,水稻的 OsHSFA6A、OsHSFC2A 及 OsHSFC2B, 大豆的 GmHSF16, 白菜的 BrHsf-23 為第 3 小群; 玉米的 ZmHSF8、 ZmHSF9 及 ZmHSF14, 阿拉伯芥的 AtHsfA1a、AtHsfA1b、AtHsfA1d、AtHsfA1d (NP 174511.2)及 AtHsfA1e, 番茄的 SlHsfA1a, 白菜的 BrHsf-29, 大豆的 GmHSF04、 GmHSF17、GmHSF33 為第4小群; 大豆的 GmHSF10 及白菜的 BrHsf-24 歸為第5 小群;大豆的 GmHSF11 及 GmHSF09,玉米的 ZmHSF2,番茄的 SIHSFA4A 及馬 鈴薯的 StHSFA5 歸為第 6 小群。第二大群細分為 5 小群,水稻的 OsHSFA2C homology X1、OsHSFA2C homology X2, 玉米的 ZmHSF7 及 ZmHSF10 為第1小 群;阿拉伯芥的 AtHsfB2a,油菜的 BrHsf-11、BrHsf-35,水稻的 OsHSFB2A 及玉 米的 ZmHSF20 為第2小群;油菜的 BrHsf-25 及番茄 SlHsfB4 為第3小群;阿拉 伯芥的 AtHsfB1,油菜的 BrHsf-01,番茄的 SlHsf24 及大豆的 GmHSF25 為第4小 群;第5小群為番茄的 SlHSFB-2a-like (圖十),親緣樹狀圖分群無法將單子葉及 雙子葉分群,分群結果分為兩大群與胺基酸保守序列組成分析分群結果一致,但 無法以耐溫度逆境之功能分群。

69

2. WRKY 轉錄因子

將 WRKY 轉錄因子胺基酸序列進行多重序列比較,以鄰接法(neighbor - joining method)建立親緣關係樹圖,單子葉及雙子葉植物(圖十一)可分為兩大群,第一大 群可細分為5小群,番茄的SlWRKY2、SlWRKY26,水稻的OsWRKY102,小麥 的 TaWRKY46 及黃瓜的 CsWRKY46 歸為第 1 小群;小麥的 TaWRKY51、 TaWRKY52,番茄的 SIWRKY27、SIWRKY60 及大豆的 GmWRKY21 分為第 2 小 群;小麥的 TaWRKY17、TaWRKY19、TaWRKY44,黃瓜的 CsWRKY4、CsWRKY23 及番茄的 SIWRKY33、SIWRKY52、 SIWRKY56 被歸類為第 3 小群;小麥的 TaWRKY33、TaWRKY48,水稻的OsWRKY62,番茄的SlWRKY53、SlWRKY62, 黄瓜的 CsWRKY21 及辣椒的 CaWRKY1 分為第 4 小群;第 5 小群為水稻的 OsWRKY39、OsWRKY51、OsWRKY66、OsWRKY68, 黃瓜的 CsWRKY18、 CsWRKY25、CsWRKY33 及小麥的 TaWRKY53。第二大群細分為2小群,第1小 群為水稻的 OsWRKY74 及小麥的 TaWRKY50, 第二小群為水稻的 OsWRKY79 及 OsWRKY45,親緣樹狀圖之分群結果無法清楚將單子葉及雙子葉植物分群,第一 大群具有單子葉與雙子葉植物,第二大群僅有單子葉植物,親緣樹狀圖分群結果 與胺基酸保守序列組成分群結果一致。並進階以耐溫度逆境功能性進行分群,在 第 1 小群之 CsWRKY46、TaWRKY46 及第 2 小群之 TaWRKY51、TaWRKY52、 GmWRKY21可被劃分成耐低溫、乾旱及鹽害逆境之小群,第3小群之TaWRKY44、 第4小群之 CsWRKY21 及第5小群之 CsWRKY18 同樣可被歸於耐低溫、乾旱及 鹽害逆境之小群,被歸於耐低溫、乾旱及鹽耐逆境之轉錄因子皆位於第一大群中。 3. DREB/CBF 轉錄因子

針對 DREB/CBF 轉錄因子胺基酸序列進行多重序列比較分析,以鄰接法 (neighbor -joining method)建立親緣關係樹圖,綜合單子葉及雙子葉植物 DREB/CBF 轉錄因子之分群結果可分為兩大群 (圖十二),第一大群可分為 6 小群,辣椒之 CaCBF1,寬葉獨行菜的 LIDREB1A,罌粟花的 PnDREB1 及阿拉伯芥之 AtDREB1A 被分為第 1 小群;大豆的 GmDREB1A-2、GmDREB1B-1、GmDREB1C-1 及 GmDREB1D-1 為第 2 小群;小麥的 TaDREB3,水稻的 OsDREB1A、OsDREB1B, 玉米的 ZmDREB1A 及多年生黑麥草之 LpCBF3 為第 3 小群;第 4 小群為大豆的 GmDREB1E-1、GmDREB1F-1 及 GmDREB1H-1;第 5 小群為小麥的 TaDREB2; 第 6 小群為大豆的 GmDREB1G-1。第二大群可分為 2 小群,玉米的 ZmDREB2A homology 1、ZmDREB2A homology x3、ZmDREB2A homology 2、ZmDREB2A homology x2、ZmDREB2A homology x1 及 ZmDREB2A homology 3,花生的 AhERF6 為第 1 小群;花生的 AhERF4 及 AhERF5,野胡蘿蔔之 DREBA6 被歸於第 2 小群, 親緣樹狀圖結果無法將單子葉及雙子葉植物清楚分群,而分群結果與胺基酸保守 序列組成之分群結果相同,皆分為兩大群,且無法以轉錄因子之功能進行更細部 之分群。

4. COR15 基因

針對 COR15 基因胺基酸序列進行多重序列比較分析,以鄰接法(neighbor -joining method)建立親緣關係樹圖,結果顯示,綜合單子葉及雙子葉作物(圖十三) 親緣關係樹圖之分群結果皆可分為兩大群,第一大群可細分為 2 小群,阿拉伯芥 之 AtCor15A,薺菜的 CbCor15A 及亞麻薺的 CsCor15A 為第1小群,油菜 BnCor15A homology X1及 BnCor15B homology X2為第2小群;第二大群僅有小麥的 Wcor15, 親緣樹狀圖分群結果與胺基酸保守序列組成分群結果一

71



圖十、HSF 轉錄因子胺基酸序列以鄰接法所產生單子葉及雙子葉植物之親緣關係 樹狀圖。

藍色扇形為第一群大群,橘色扇形的為第二大群。

Figure 10. Neighbor-joining phylogenetic tree of HSF transcription factor in monocotyledons and dicotyledons.

And blue sector indicate cluster I, orange sector indicate cluster II.

註:Os 為水稻、Zm 為玉米、At 為阿拉伯芥、Br 為白菜、Gm 為大豆、Sl 為番茄, St 為馬鈴薯。



圖十一、WRKY 轉錄因子胺基酸序列以鄰接法所產生單子葉及雙子葉植物之親緣 關係樹狀圖。

灰色扇形為第一群大群,紅色扇形為第二大群,黑色箭頭指示為耐低溫、鹽害及 乾旱逆境之轉錄因子。

Figure 11. Neighbor-joining phylogenetic tree of WRKY transcription factor in monocotyledons and dicotyledons.

And gray sector indicate cluster I, red sector indicate cluster II, and black arrow indicate transcription factor under cold, salt and drought stress.

註:Os 為水稻、Ta 為小麥、Ca 為辣椒、Cs 為黃瓜、Gm 為大豆、Sl 為番茄。



圖十二、DREB/CBF 轉錄因子胺基酸序列以鄰接法所產生單子葉及雙子葉植物之 親緣關係樹狀圖。

藍色扇形為第一群大群,綠色扇形為第二大群。

Figure 12. Neighbor-joining phylogenetic tree of DREB/CBF transcription factor in monocotyledons and dicotyledons.

And blue sector indicate cluster I, green sector indicate cluster II.

註:An 為花生、At 為阿拉伯芥、Gm 為大豆、Ll 為寬葉獨行菜、Lp 為多年生黑麥 草、Os 為水稻、Pn 為罌粟花、Ta 為小麥、Zm 為玉米、Ca 為辣椒、Dc 為野胡蘿 蔔。



0.050

圖十三、COR15 基因胺基酸序列以鄰接法(neighbor joining method)產生單子葉及雙子葉植物之親緣關係樹狀圖。

Figure 13. Neighbor-joining phylogenetic tree of *COR15* gene between monocotyledons and dicotyledons.

註:At 為阿拉伯芥、Bn 為油菜、Cb 為薺菜、Cs 為亞麻薺、W 為小麥。

五、討論

(一)HSF 轉錄因子分析

1. 全基因序列及高度相似性區域 G/C 所佔的比率



HSF 轉錄因子在植物中序列總長差異大,介於 747 bp (白菜的 BrHsf-15)-8272 bp (水稻的 OsHSF42C)之間,在單子葉作物全基因所佔 G/C 的比率介於 40.3 % - 63.6%間(表二),雙子葉植物全基因所佔 G/C 的比率介於 29.3% - 55.5%(表 三)。相較於單子葉作物,雙子葉植物在全基因體中所佔的 G/C 的比率較單子葉作 物低;而單子葉高度相似性片段中 G/C 所佔的比率介於 52.3% - 67.7%,雙子葉 植物高度相似性片段中 G/C 所占的比率介於 29.1% - 51.9%,可知在高度相似性 片段中單子葉作物所佔的 G/C 含量較雙子葉植物高,且雙子葉植物全基因序列與 高度相似性片段 G/C 所佔的含量接近。根據前人研究,基因體中雙子葉植物 G/C 所佔的比率約為46%,單子葉植物 G/C 所佔的比率約在 60% - 70% (Salinas et al., 1988; Carels et al., 1998;楊, 2008;鍾, 2009),就本研究結果,單子葉與雙子葉植物 之以 HSF 轉錄因子全基因序列及高度相似性序列所佔之 G/C 之比率普遍低於一般 基因體之組成,且變異範圍更廣,故單子葉與雙子葉植物 HSF 轉錄因子中高度相 似性序列 G/C 之比率未有明顯之差異。

2.核苷酸及胺基酸序列高度相似性片段

比對單子葉作物及雙子葉植物之核苷酸序列(圖一),單子葉作物 5416 bp -5468 bp 之區間(圖一 A)及雙子葉植物 1417 bp - 1484 bp 之區間(圖一 C),兩處片 段具有高度相似性;比對單子葉作物 7701 bp - 7740 bp 之區間(圖一 B)、雙子葉 5359 bp - 5421 bp 之區間(圖一 C)及綜合單子葉及雙子葉植物 6610 bp - 6650 bp 之 區間(圖一 D),在單子葉作物、雙子葉植物及綜合單子葉及雙子葉植物中,此三區 間之片段具有高度相似性,而此區間之連續高度相似性片段在單子葉及雙子葉植 物中皆有,可見此高度相似性片段之重要性,此高度相似性片段位於 HSF 轉錄因 子的 DNA binding domain 上,因此可針對此片段設計退化性引子,作為 HSF 轉錄 因子之篩選利用。

針對 HSF 轉錄因子胺基酸序列比對作物物種間之保守性,在轉譯起始點 -Methionine 至 DNA binding domain 前,物種間胺基酸序列具極高的歧異度,比對 DNA binding domain (圖五)及 HRA/B Domain (圖六),在單子葉及雙子葉植物中皆 具有高度相似性。Guo et al. (2008)將水稻及阿拉伯芥共 51 個 HSF 轉錄因子,針 對 DNA binding domain 及 HR A/B Domain 進行胺基酸多重序列比對,在 DNA binding domain 中約有 100 個胺基酸在水稻及阿拉伯芥中具有保守性,HR A/B Domain 中約有 50 個胺基酸在兩物種間具有保守性。Lin et al. (2011)針對玉米 25 個 HSF 轉錄因子進行多重序列比對 DNA binding domain、HR A/B Domain,在 25 個轉錄因子中 DNA binding domain及 HR A/B Domain 皆具有高度的保守性;Li et al. (2014)將大豆 38 個 HSF 轉錄因子進行多重序列比較 DNA binding domain 與 HR A/B Domain,在 DNA 鍵結區中,100 個胺基酸約有 75%胺基酸序列呈保守性, HR A/B Domain 約 50%-75%胺基酸序列呈保守性,本研究與前人研究結果相似, 即在 DNA binding domain及 HR A/B Domain 在不同物種間或物種內皆具有高度的 保守性。

本研究針對單子葉作物高度保守性片段設計兩對引子,第一對引子 HSF-F1/HSF-R1預期可增幅 2300 bp,第二對引子HSF-F2/HSF-R2預期可增幅2200 bp的片段,此引子僅能利用在單子葉作物中作為篩選HSF 轉錄因子之工具,在雙 子葉植物中高度相似性片段變異較單子葉作物大,因此無法利用本試驗所設計之 引子作為篩選工具,本研究所設計引子能使用之物種較為侷限,僅可供玉米及水 稻之利用,若要作為篩選其他物種之工具,則需另外設計引子。

3.親緣關係分析

以單子葉及雙子葉植物胺基酸序列建立親緣樹狀圖,分群可分為兩大群,第 一大群可細分為6小群,第二大群中具有5小群(圖十)。Li et al. (2014) 針對大 豆、玉米及阿拉伯芥三種作物之 HSF 轉錄因子之 DNA binding domain 胺基酸序列 建立親緣關係樹圖,分群結果可分為 A、B、C 三大群及 12 個亞群; Song et al. (2014) 針對白菜、阿拉伯芥、水稻、可可及香蕉五種作物,共 150 個 HSF 轉錄因子之 DNA binding domain 胺基酸序列建立親緣關係樹圖,分群結果可分為 A、B、C 三大群 及 9 個亞群。前人研究結果與本研究結果有出入,本研究以胺基酸序列保守性作 為分群依據,目的是探討是否具有群間特有之胺基酸序列,而前人研究是依 HSF 轉錄因子之 DNA binding domain 序列結構而分群,分群依據不同,導致不同解釋 結果,雖然僅依轉錄因子之 DNA binding domain 可獲得較好的分群結果,但是依 據整個胺基酸序列分群,則更具有整個轉錄因子胺基酸序列之代表性。

在物種間 HSF 兩處核苷酸連續高度相似性片段位於 DNA binding domain 上, 綜合單子葉或雙子葉植物之連續高度相似性片段,單子葉植物 5416 bp - 5468 bp 區間轉譯後之胺基酸序列對應位置位於 DNA binding domain 第62-77 個胺基酸上, 綜合單子葉及雙子葉植物 6610 bp - 6650 bp 之區間,轉譯後胺基酸序列對應之第 93-104 個胺基酸中。而在物種中核苷酸序列變異大,但轉譯出之蛋白質在物種間 具有保守性,更加驗證了物種間核苷酸與胺基酸序列之保守關係,其針對核苷酸 高度相似性片段所設計之引子具有參考價值。

(二) WRKY 轉錄因子分析

1. 全基因序列及高度相似性區域 G/C 所占的比率

WRKY 轉錄因子全基因序列在植物物種間所佔的比率較單子葉植物低。在高 度相似性片段中,單子葉作物 G/C 比率在 54% - 74.8%間,雙子葉植物 G/C 比率 在 21.9% - 43.6%,可見高度相似性片段中單子葉作物 G/C 所佔的比率較雙子葉 植物高,在雙子葉之植物中全基因序列及高度相似性片段 G/C 所佔比率相近,Song et al. (2016)針對大豆 171 個 WRKY 轉錄因子進行 G/C 含量分析,171 個 WRKY 轉錄因子平均 G/C 含量為 45.15%,前人研究結果與本研究雙子葉植物所佔 G/C 的比率結果相符,因此可依作物G/C 所佔的比率區分單子葉及雙子葉作物之差異。

針對 WRKY 連續高度相似性片段設計引子,分別設計一個正向、兩個反向之

引子,WRKY-F1/WRKY-R1預期可擴增出約420bp之片段,WRKY-F1/WRKY-R2 推測可擴增出約400bp之片段,引子設計以單子葉作物高度相似性片段區間作為 設計模板,在物種間WRKY核苷酸序列歧異度大,因此設計出之引子較適合用於 單子葉植物WRKY轉錄因子上之研究。

2. 核苷酸及胺基酸序列高度相似性片段

比對 WRKY 轉錄因子核苷酸序列,單子葉作物 8867 bp-8902bp 之區間(圖二 A),雙子葉植物 5812bp - 5833bp 之區間(圖二 B)及綜合單子葉及雙子葉植物 4329bp - 4346 bp 之區間(圖二 C),此三區間片段在物種間具有高度相似性;在單 子葉作物在 9052 bp - 9104 bp 之區間(圖二 D),雙子葉植物在 5925 bp - 5997bp 處 (圖二 E),及單子葉植物與雙子葉植物 4371 bp - 4421 bp 區間(圖二 F),在物種 間此三片段具有高度相似性,上述之連續高度相似性片段在單子葉及雙子葉植物 間皆存在,可見高度相似性片段之重要性,而高度相似性片段位於 WRKY 轉錄因 子之 DNA binding domain 上,因此可針對連續高度相似性片段設計單子葉與雙子 葉植物可共同使用之引子,作為研究 WRKY 轉錄因子之工具。

比對物種間 WRKY 轉錄因子之胺基酸序列,在轉譯起始點一Methionine 至 DNA binding domain 前,物種間之胺基酸序列具有極高的歧異度,但在 WRKY domain 前20個胺基酸中,具有第一大群及第二大群特有之高度相似性胺基酸序列, 第一大群特有之序列為第一個胺基酸 T、第二個胺基酸 S 及第 13 個胺基酸 D (圖 七 B),第 17-18 個胺基酸 LD(圖七 B)為第二大群特有序列,本研究所發現之序列 在前人研究中較少被探討,可作為 WRKY 轉錄因子之分群參考依據。後針對 DNA binding domain (WRKY Domain)與 Zinc fingers (圖七 B)在植物物種間探討保守性, 在單子葉及雙子葉植物中皆具有極高的保守性, Zhou et al. (2008) 針對大豆 58 個 WRKY 轉錄因子進行多重序列比較分析,在 DNA binding domain 與 Zinc fingers 區,在 58 個轉錄因子具有高度的保守性; Wei et al. (2008) 比對小麥、阿拉伯芥、 水稻、菸草及香芹等五種作物,共有 11 個 WRKY 轉錄因子進行多重序列比較分 析, DNA binding domain 及 Zinc fingers 在物種間具有高度的保守性;上述研究成果與本研究結果相符合, 在 DNA binding domain 及 Zinc fingers 在物種間具有高度的保守性,亦顯示 WRKY 轉錄因子之重要性。

探討核苷酸序列與胺基酸序列之關係,在單子葉及雙子葉植物中皆具有兩處 連續高度相似性核苷酸片段,而兩處高度相似性片段轉譯後之蛋白質被證實為位 於WRKY 轉錄因子之WRKY domain 上,單子葉及雙子葉植物 4329 bp-4346 bp 之區間,轉譯後之胺基酸相對應位置在WRKY domain 的第40-43 個胺基酸,及 4371 bp-4421 bp之區間轉譯後對應之胺基酸位置位於第53-70 個胺基酸之區間, 可知核苷酸高度相似性序列與胺基酸序列具有一定程度之保守關係,因此針對此 連續高度相似性片段設計引子具有其參考價值,可作為研究WRKY 轉錄因子之工 具。

3. 親緣關係分析

將單子葉及雙子葉植物的 WRKY 轉錄因子之胺基酸序列建立親緣樹狀圖,分 群可分為兩大群(圖十一),大群間有數個小群,第一大群可細分為5個小群,第 二大群可分為2小群。曾有學者將小麥、大豆、水稻、阿拉伯芥等四種作物共50 個 WRKY 轉錄因子之 WRKY domain 建立親緣樹狀圖,結果可分為I、II、III 等三 大群,其中 II 群又可區分為5個亞群 (Niu et al., 2012)。前人研究結果與本試驗有 差異,試驗分群結果第一大群中包含 I、III 大群、第二大群中僅有 II 大群,本研 究分群是以胺基酸序列作為分群依據(第一大群為 Zinc finger C2H2 型、第二大群 為 C2HCZinc finger 型),而前人分群研究結果僅依 WRKY domain 保守序列進行分 群,故知分群之差異為分群依據不同導致。

依轉錄因子功能分群,在第1小群的CsWRKY46、TaWRKY46及第2小群的 TaWRKY51、TaWRKY52 可被劃分成耐低溫、乾旱及鹽害逆境小群,比對 4 個 WRKY 轉錄因子胺基酸序列,在CsWRKY46及 TaWRKY46 兩個 WRKY 轉錄因 子胺基酸序列具有高度相似性;在 TaWRKY51、TaWRKY52 也具有胺基酸序列高 度相似性,因此可推測具有此高度相似性之胺基酸序列為可調控低溫、乾旱及鹽 害逆境之功能性序列,且被劃分為耐低溫、乾旱及鹽害逆境之小群皆位於第一大 群中,因此第一大群之胺基酸序列可被視為調控低溫、乾旱及鹽害逆境之重要序 列。

(三)DREB/CBF 轉錄因子分析

1. 全基因序列及保守片段 G/C 所佔比率

在物種間 DREB/CBF 轉錄因子全基因序列總長介於 567 bp (大豆的 GmDREB1E-1)-3366 bp(玉米的 ZmDREB2A)之間,在單子葉及雙子葉植物中,全 基因序列總長差異極大,並針對物種全基因序列 G/C 所佔之比率探討,單子葉作 物在全基因序列 G/C 所佔的比率介於 45.5 % -67.2 %間(表六),雙子葉植物在 全基因序列中 G/C 所佔的比率介於 38.1% -55.2%(表七),在雙子葉植物全基因 序列 G/C 所佔之比率較單子葉作物低;比較物種之高度相似性片段 G/C 所佔的比 率,在單子葉作物中 G/C 所佔的比率介於 56.8% - 70.6%間,雙子葉植物 G/C 所 佔的比率介於 45.9% - 55.7%間,單子葉作物於高度相似性片段所佔之 G/C 的比 率較雙子葉植物高。前人研究之雙子葉植物在核內基因體之 G/C 的比率約占46%, 而單子葉植物在核內基因體之 G/C 所佔的比率介於 60% - 70%間 (Salinas et al., 1988; Carels et al., 1998; 楊, 2008; 鍾, 2009),因此,可依據 G/C 的比率區分單子葉 及雙子葉之 DREB/CBF 轉錄因子。

2. 核苷酸及胺基酸序列高度相似性片段

針對物種間 DREB/CBF 轉錄因子比對其核苷酸序列之保守性 (圖三), 在單子 葉作物中 2411 bp - 2430 bp 之區間 (圖三 A)、雙子葉植物 1082 bp - 1101 bp 之區 間(圖三 C), 及綜合單子葉及雙子葉植物 2543 bp - 2562 bp 之區間(圖三 E), 此三 區間具高度相似性,綜合單子葉及雙子葉植物 DREB/CBF 轉錄因子 2543 bp - 2562 bp 之區間, 在 2543 bp (T)、、2549 bp - 2550 bp (GG)、2553 bp (T)、2556 bp (G) 及 2562 bp (G)處有單子葉及雙子葉植物之共同核苷酸保守序列, 在 2548 bp (C)及 2552 bp (C)處有單子葉植物高度相似性核苷酸序列;在單子葉作物 2453 bp - 2481 bp 之區間(圖三 B)、雙子葉作物 1109 bp - 1137 bp 之區間(圖三 D)及綜合單子葉與 雙子葉植物 2585 bp - 2613 bp 之區間(圖三 F)進行核苷酸序列比對,此片段在物種 間具有高度相似性,在單子葉及雙子葉植物 2585 bp - 2613 bp 之區間,在 2591 bp - 2594 bp (TGGG)、2600 bp - 2601 bp (GA)、2604 bp (T)、2607 bp (G)及 2612 bp -2613 bp(CC)處具有單子葉及雙子葉植物共同保守序列,且在 2587 bp (G)、2599 bp (C)、2605 bp (G)、2611 bp (G)處為單子葉植物高度相似性序列,綜合上述,可知 DREB/CBF 轉錄因子在物種極具保守性,且保守性較其他轉錄因子高,則可利用 研究結果之兩處連續高度相似性片段,片段位於 DREB/CBF 轉錄因子之 DNA binding domain 上,因此可針對高度相似性片段設計引子,以作為研究不同植物的 DREB/CBF 轉錄因子之參考。

將DREB/CBF 轉錄因子之胺基酸序列在不同物種間進行多重序列比較(圖八), 在轉譯起始點至 AP2 domain 前,具有第一大群特有之高度相似性序列 PKKP/AGR/KFR/ETR/HPV之NSL序列,此序列為DREB/CBF 轉錄因子之特有序 列,因此在第一大群間具此高度相似性之胺基酸序列,前人針對玉米、水稻、小 麥、阿拉伯芥、番茄及油菜等植物之CBF/DREB1 轉錄因子之胺基酸多重序列比較 分析,在6種物種中NSL序列在物種間具有高度的相似性(Qin et al., 2004),與 本研究結果符合,而本研究第一大群多為DREB1 轉錄因子,因此第一大群之高度 相似性序列之分群結果吻合前人結果。AP2 Domain(圖八)在單子葉及雙子葉植物 中均具有極高的保守性,前人針對阿拉伯芥、番茄、多年生黑麥草、小麥、大麥 及水稻,6種物種12 個DREB/CBF 轉錄因子進行多重胺基酸序列比較,發現在物 種間之DREB/CBF 轉錄因子具有保守性,尤在轉錄因子之 AP2 domain 在物種間具 有高度的保守性(Xiong and Fei, 2006);此外Akhtar et al. (2015)針對阿拉伯芥、 薺菜、菸草、山萮菜屬(Eutrema)、菥葉(Thlaspi arvense)、白馬花蘭及芥菜等7種 作物與高山離子芥進行序列比對,結果發現高山離子芥與7種植物間之DREB/CBF

82

轉錄因子序列的相似度介於 75%(芥菜的 DREB1B)-81%(薺菜 DREB1A)之間,其 中在雙子葉植物中 AP2 domain 具有高度的保守性,此研究結果與本研究結果相符, 可說明 AP2 domain 的保守性,對 DREB/CBF 轉錄因子調控植物面臨溫度逆境之重 要性。

針對 DREB/CBF 連續高度相似性片段設計之引子共有兩組,為 DREB-F1/DREB-R2預期能擴增片段長度為64 bp,第二組引子 DREB-F2/DREB-R2 預期能擴增 59 bp,DREB/CBF 擴增長度較 HSF 及 WRKY 轉錄因子短,其為 DREB/CBF 轉錄因子在物種間之高度相似性片段延續之片段長較短所致,但在物 種間 DREB/CBF 高度相似性片段具有保守序列,因此所設計之引子可通用於單子 葉及雙子葉植物,可做為研究物種 DREB/CBF 之通用引子。

3. 親緣關係分析

將物種間 DREB/CBF 轉錄因子之胺基酸序列進行多重胺基酸序列比較分析, 並以臨接法建立親緣樹狀圖,親緣樹狀圖分群結果可分為兩大群 (圖十二),第一 大群大多為 DREB1 轉錄因子,第二大群多為 DREB2 轉錄因子,DREB1 轉錄因子 在物種間具有 NSL 序列(PKKP/RAGRxxKFxETRHP)之保守性,第二大群則無 NSL 序列之保守性,在大群中又可細分數個小群,第一大群中可細分為 6 小群,第二 大群可分為 2 小群。前人針對阿拉伯芥、日日春、菸草、油菜、大麥、黑麥及小 麥,7 個物種共 45 個 ERF/AP2 domain 家族進行多重序列比較分析,並建立親緣關 係樹狀圖,分群結果共可分為 DREB、RAV、ERF 及 AP2 四大群,其中最大群分 別為 ERF 及 DREB 雨群 (Dubouzet *et al.*, 2003);又有學者針對玉米、小麥、水稻、 黑麥、大麥、棉花、番茄、可可及油菜等 9 種作物 48 個 ERF/AP2 domain 家族進 行多重序列比較分析,並建立親緣關係樹,分群結果共可分為 DREB、ERF、AP2 及 RAV 等四大群 (Qin *et al.*, 2004)。由於本研究所分析的 AP2/EREBP 轉錄因子家 族皆為 DREB 與 ERF 亞群,故無法針對另兩類分群,而本研究係以全基因之胺基 酸序列作為分群依據,不同於前人研究僅以 ERF/AP2 domain 而分群,因此具有不 同之分群結果。

DREB/CBF 轉錄因子兩處核苷酸連續高度相似性片段,轉譯後之胺基酸序列 位於 AP2 domain 上,核苷酸片段與胺基酸片段相對相對位置分別為,單子葉與雙 子葉植物 2543 bp - 2562 bp 之區間於 AP2 domain 第45 - 50 個胺基酸之區間,及 2585 bp - 2613 bp 之區間位在 AP2 domain 第59 - 66 個胺基酸上,在 DREB/CBF 轉錄因子中,核苷酸連續高度相似性片段與 AP2 domain 胺基酸序列具有保守性, 且在核苷酸高度相似性片段中,片段內具有核苷酸的變異,但核苷酸的變異不會 造成胺基酸序列之改變,因此此連續性片段可作為設計引子之區間,而設計之引 子具有其價值。

(四)COR15 基因與 DREB/CBF 轉錄因子之關係

COR15 基因為 DREB/CBF 轉錄因子調控之基因,而 DREB/CBF 轉錄因子之 DREB1A 轉錄因子為調控 COR15A 基因在低溫逆境下之表現,透過 DREB/CBF 轉 錄因子複雜且精細的調控網絡,可提升植物在低溫逆境下之耐受力 (Zhou et al., 2012),在阿拉伯芥中受到 DREB1A 之調控基因除了 COR15A,尚有 RD29A/COR78, KIN1,KIN2,RD17/COR47 及 ERD10 (Kasuga et al., 1999),而本研究則針對不同 物種間之 COR15A 進行核苷酸、胺基酸保守性序列分析。

1. 序列及保守區域 G/C 所占的比率

植物物種間之 COR15 基因核苷酸序列差異甚大,全基因序列總長介於 686 bp (油菜的 BnCor15B) - 4549 bp (小麥的 Wcor15),雙子葉植物序列 G/C 所佔的比率 介於 33.4% - 42% (表八),而單子葉作物全基因序列 G/C 所佔的比率為 46.7% (表 九),單子葉作物及雙子葉植物全基因、高度相似性之 G/C 所佔的比率,皆低於一 般植物基因體之 G/C 的比率。

2. 核苷酸及胺基酸序列保守片段

將單子葉作物及雙子葉植物 COR15 基因進行核苷酸序列多重比較分析 (圖四), 在阿拉伯芥之 99 bp - 103 bp 之區間之序列為 CCGAC ,此區間即為 DREB/CBF 之 CBF element 的核心保守序列 (CCGAC),顯示此區間之序列可藉由與 DREB/CBF 轉錄因子結合,進而調控 COR15 在低溫逆境下之表現 (Baker et al., 1994; Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 1994; Thomashow, 1999; Thomashow, 2001),更加驗證了 COR15 基因與 DREB/CBF 轉錄因子在低溫逆境下調控之關係。 而在 404 bp - 444 bp 及 1497 bp - 1532 bp 之區間中,單子葉作物及雙子葉植物具 有高度相似性,在404-444 bp之區間,有非連續之21 bp 核苷酸序列在物種間有 保守性;1497 bp – 1532 bp 之區間有非連續之 22 bp 核苷酸序列,此兩區間在單子 葉及雙子葉植物中具保守性,可知此兩片段在物種間極具重要性,因此可針對此 連續性片段設計通用引子作為研究 COR15 基因之工具。針對 COR15 基因進行多 重胺基酸序列比較 (圖九),在雙子葉植物中胺基酸序列具高度相似性(圖九A),其 中在第55至100個胺基酸雙子葉植物呈保守性;在單子葉及雙子葉植物中,COR15 基因胺基酸序列具高度相似性(圖九 B),其中在第1、2、4、6、13、46、52、62、 68、72、76 – 77、83、85、88、90、102、106、109、133 及 177 個胺基酸在物種 間具有保守性。Zhou et al. (2012) 針對阿拉伯芥、拟南芥、薺菜、深山南芥、山萮 菜屬、高山梨子芥及油菜等十字花科植物間之 COR15 基因,發現 COR15 基因在 十字花科作物中具高度的保守性,此結果與本研究結果相符(圖九A及圖九B), 綜合單子葉及雙子葉植物之保守序列與前人研究相同。在雙子葉植物中 COR15 基 因具高度的保守性,比對雙子葉植物與單子葉作物之 COR15 基因胺基酸序列,結 果顯示,單子葉及雙子葉植物之共同保守序列較雙子葉植物少,其可能為單子葉 作物與雙子葉作物在演化上之差異,但 COR15 基因皆為作物面對低溫逆境時重要 調控基因。

3. 親緣關係分析

針對單子葉與雙子葉作物進行多重序列比較 COR15 基因胺基酸序列,以臨接法建立親緣關係樹圖,分群結果可分為兩大群(圖十三); Zhou et al. (2012) 針對十字花科作物進行多重序列比較並建立親緣關係樹圖,分群結果可分三群,阿拉

伯芥、拟南芥、薺菜為第一大群,山萮菜屬、油菜為大二大群,第三大群是薺菜 CbCOR15為外群。本研究結果在雙子葉植物中分為雨大群,阿拉伯芥、薺菜、亞 麻薺為第一大群,油菜為第二大群,顯示在雙子葉植物物種間 COR15 基因具有高 度保守性;進階比對單子葉作物與雙子葉植物 COR15 之親緣關係,結果可分為雨 大群,第一大群為雙子葉植物,而第二大群為單子葉作物,結果顯示,COR15 基 因在單子葉作物及雙子葉作物中具有明顯的差異性,在第 38 - 39 (雙子葉 VG,單 子葉 L-)、43 - 44 (雙子葉 KT,單子葉 PC)、48 - 49 (雙子葉 VV,單子葉-A)、51 (雙 子葉 Q,單子葉-)、53 - 56 (雙子葉 KKSL,單子葉 PRT-)、58 - 59 (雙子葉 YAA,單 子葉-SG)、61 (雙子葉 K,單子葉-)、63 - 66 (雙子葉 DGNI,單子葉-R-L)、69 - 71(雙 子葉 K,單子葉 N)、84 (雙子葉 S,單子葉 A)、92 (雙子葉 T,單子葉 I)、94(雙子葉 K,單子葉 G)、96 - 98 (雙子葉 EAL,單子葉 KGV)、105 (雙子葉 A,單子葉-)、107 - 108(雙子葉 DY,單子葉 G-)、110 (雙子葉 V,單子葉 A)、143 (雙子葉 E,單子葉 D) 個胺基酸具有單雙子葉植物之差異,此種差異是否影響單子葉及雙子葉植物間 對低溫逆境之反應,尚待近一步之探討。

本研究針對 HSF、WRKY、DREB/CBF 三大與溫度逆境相關之轉錄因子及 COR15 基因進行核苷酸序列組成及胺基酸序列保守性進行分析,發現在 HSF、 DREB/CBF 轉錄因子及 COR15 基因之核苷酸全基因序列長度及高度相似性片段的 G/C 的含量在單子葉植物與雙子葉植物之間均未有明顯差異。針對核苷酸序列進行 多重序列比較,HSF、WRKY、DREB/CBF 轉錄因子及 COR15 基因,在單子葉或 雙子葉植物中皆具有高度相似性,且皆具有核苷酸連續性保守片段,並且針對此 連續性保守片段設計引子,作為轉錄因子及其所調節之基因的分析工具。將胺基 酸序列進行多重序列比較,HSF、WRKY、DREB/CBF 轉錄因子的 DNA binding domain 在物種間具有高度的保守性,COR15 基因在雙子葉植物中具有高度的保守



#### 六、 結論

近年來針對植物耐溫度逆境之轉錄因子研究甚多,可見極端溫度對於育種目 標之改變及重要性,但皆缺乏一個綜合性的研究,因此本研究針對影響植物溫度 逆境之三大轉錄因子及相關之 COR15 基因進行整體性的研究,並希望能找出核苷 酸連續性保守片段,藉以設計引子作為未來研究或分析三大轉錄因子及 COR15 基 因之工具。

本研究發現在 DNA binding domain 中,三大轉錄因子皆具有高度的保守性; 而 COR15 基因則在雙子葉植物中具有高度的保守性。最後依據 HSF、WRKY、 DREB/CBF 轉錄因子及 COR15 基因胺基酸序列建立親緣關係樹圖,更加印證了胺 基酸保守序列之分析結果。同時本研究亦發現 DREB/CBF 轉錄因子及其共同所調 節之 COR15 基因間具有共同之核心保守序列 (CCGAC),此序列與植物自身調節 面對低溫逆境有關。本研究獲得與溫度逆境相關基因之保守序列,並且設計物種 間通用之引子,可供未來相關研究利用,未來可利用探討耐溫度或不耐溫度逆境 種原或品系之核苷酸序列差異。

88

#### 參考文獻

- 楊雅淇。2008。作物葉綠體 DNA 序列變異之辨識及應用。國立臺灣大學農藝學研究所碩士論文。
- 鍾瑩。2009。作物物種間葉綠體 DNA 保留序列之搜尋及應用。國立臺灣大學農藝 學研究所碩士論文。
- Afrin, S., J. Zhu, H. Cao, J. Huang, H. Xiu, T. Luo, and Z. Luo. 2015. Molecular cloning and expression profile of an abiotic stress and hormone responsive MYB transcription factor gene from Panax ginseng. Acta Biochim. Biophys. Sin. 47: 267–277.
- Agarwal, P. K., P. Agarwal, M. K. Reddy, and S. K. Sopory. 2006. Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. Plant Cell Rep. 25: 1263–1274.
- Akhtar M., A. Jaiswal, E. Ahmad, J. P. Jaiswal. M. I. Qureshi, M. Tufchi, A. Kumar, and N. K. Singh. 2015. Molecular cloning and characterization of cold – induced gene encoding DRE-binding transcription factor from cold-arid adapted ecotype of *Lepidium latifolium* L. Indian J. Biotechnol. 14: 26–32.
- Artus, N. N., M. Uemura, P. L. Steponkus, S. J. Gilmour, C. Lin, and M. F. Thomashow. 1996. Constitutive expression of the cold-regulated *Arabidopsis thaliana COR15a* gene affects both chloroplast and protoplast freezing tolerance. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 13404–13409.
- Baker, S. S., K. S. Wilhelm, and M. F. Thomashow. 1994. The 50-region of Arabidopsis thaliana cor15a has cis-acting elements that confer cold-, drought- and ABA-regulated gene expression. Plant Mol. Biol. 24: 701–713.
- Bohnert H. J., D. E. Nelson, and R. G. Jensen. 1995. Adaptation to environmental stress. Plant Cell 7: 1099–1111.

- Canella D., S. J. Gilmour, L. A. Kuhn, M. F. Thomashow. 2010. DNA binding by the Arabidopsis CBF1 transcription factor requires the PKKP/RAGRxKFxETRHP signature sequence. Biochim. Biophys. Acta. 1799: 454–462.
- Carels, N., P. Hatey, K. Jabbari, and G. Bernardi. 1988. Compositional properties of homologous coding sequences from plant. J. Mol. Evol. 46: 45–53.
- Cattivelli, L., and D. Bartels. 1990. Molecular cloning and characterization of cold-regulated genes in barley. Plant Physiol. 93: 1504–1510.
- Chauvin, L. P., M. Houde, and F. Sarhan. 1993. A leaf-specific gene stimulated by light during wheat acclimation to low temperature. Plant Mol. Biol. 23: 255–265.
- Chen, L., Y. Song, S. Li, L. Zhang, C. Zou, and D. Yu. 2012. The role of WRKY transcription factors in plant abiotic stresses. Biochim. Biophys. Acta. 18191: 120–128.
- Chen, L., Y. Yang, C. Liu, Y. Y. Zheng, M. S. Xu, and N. Wu. 2015. Characterization of WRKY transcription factor in *Solanum lycopersicum* reveals collinearity and their expression patterns under cold treatment. Biochem. Biophys. Res. Commun. 464: 962–968.
- Chen, N., Q. Yang, M. Su, L. Pan, X. Chi, M. Chen, Y. He, Z. Yang, T. Wang, M. Wang, and S. Yu. 2012. Cloning of six ERF Family transcription factor genes from peanut and analysis of their expression during abiotic stress. Plant Mol. Biol. Rep. 30: 1415–1425.
- Chen, X., Y. Wang, B. Lv, J. Li, L. Luo, S. Lu, X. Zhang, H. Ma, and F. Ming. 2014. The NAC family transcription factor OsNAP confers abiotic stress response through the ABA pathway. Plant Cell Physiol. 55: 604–619.
- Dellagi, A., J. Helibronn, A. O. Avrova, M. Montesano, E. T. Palva, and H. E. Stewart. 2000. A potato gene encoding a WRKY-like transcription factor is induced in

interactions with *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and *Phytophthora infestans* and is coregulated with class I endochitinase expression. Mol. Plant Microbe. Interact. 13: 1092–1101.

- Dubouzet, J. G., Y. Sakuma, Y. S. Ito, M. kasuga, E. G. Dobouzet, S. S. Miura, M. T. Seki, K. Z. Shinozaki, and K. Yamaguchi-Shinozaki. 2003. OsDREB gene in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-saltand cold-responsive gene expression. The Plant Journal 33: 751–763.
- Edgar, R. C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic Acids Res. 32: 1792–1797.
- Eulgem, T., P. J. Rushton, and E. Schmelzer. 1999. Early nuclear events in plant defense: rapid gene activation by WRKY transcription factors. EMBO J. 18: 4689–4699.
- Gao, J. P., D. Y. Chao, and H. X. Lin. 2007. Understanding abiotic stress tolerance mechanisms: recent studies on stress response in rice. J. Integr. Plant Biol. 49: 742– 750.
- Guo, J. K., J. Wu, Q. Ji, C. Wang, L. Luo, Y. Yuan, Y. H. Wang, and J. Wang. 2008. Genome-wide analysis of heat shock transcription factor families in rice and arabidopsis. J. Genet. Genomics 35: 105–118.
- He, G. H., J. Y. Xu, Y. X. Wang, J. M. Liu, P. S. Li, M. Chen, Y. Z. Ma, and Z. S. Xu.
  2016. Drought-responsive WRKY transcription factor genes *TaWRKY1* and *TaWRKY33* from wheat confer drought and/or heat resistance in arabidopsis. BMC Plant Biology 16: 1–16.
- Hu, W. H., G. C. Hu, and B. Han. 2009. Genome-wide survey and expression profiling of heat shock proteins and heat shock factors revealed overlapped and stress specific response under abiotic stresses in rice. Plant Sci 176: 583–590.

Huang, Y., Z. Xu, F. Wang, M. Li, J. Ma, A. Xiong. 2015. Cloning and expression

profiles analysis under abiotic stress of cold stress transcription factor gene *DcICE1* from *Daucus carota*. Acta Bot. Boreal. – Occident. Sin. 35: 30–36.

- Huang, Z., J. He, X. J. Zhong, H. D. Guo, S. H. Jin, X. Li and, L. X. Sun. 2016. Molecular cloning and characterization of a novel freezing-inducible DREB1/CBF transcription factor gene in boreal plant Iceland poppy (Papaver nudicaule). Genet. Mol. Biol. 39: 616–628.
- Hwang, E. W., K. A. Kim, S. C. Park, M. J. Jeong, M. O. Byun, and H. B. Kwon. 2005. Expression profiles of hot pepper (Capsicum annuum) genes under cold stress conditions. J. Biosci. 30: 657–667.
- Jaglo, K. R., S. Kleff, K. L. Amundsen, X. Zhang, V. Haake, J. Z. Zhang, T. Deits, M. F. Thomashow. 2001. Components of the arabidopsis C-repeat/dehydration responsive element binding factor cold-response pathway are conserved in *Brassica napus* and other plant species. Plant Physiol. 127: 910–917.
- Karam, B. S., C. F. Rhonda, and O. S. Luis. 2002. Transcription factors in plant defense and stress response. Curr. Opin. Plant Biol. 5: 430–436.
- Kasuga, M., Q. Liu, S. Miura, K. Yamaguchi-Shinozaki, and K. Shinozaki. 1999. Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. Nat. Biotechnol. 17, 287–291.
- Kidokoro, S., K. Watanabe, T. Ohori, K. Maruyama, J. Mizoi, N. Myint, P. S. Htwe, Y. Fujita, S. Sekita, K. Shinozaki, and Y. Shinozaki. 2015. Soybean DREB1/CBF-type transcription factors function in heat and drought as well as cold stress-responsive gene expression. The Plant Journal 81: 505–518.
- Kilian, J., D. Whitehead, J. Horak, D. Wanke, S. Weinl, O. Batistic, C. D'Angelo, E. Bornberg-Bauer, J. Kudla, and K. Harter. 2007. The AtGenExpress global stress expression data set: protocols, evaluation and model data analysis of UV-B light,

drought and cold stress responses. Plant J. 50: 347–363.

- Kim, S., C. S. An, Y. N. Hong, and K. W. Lee. 2004. Cold-inducible transcription factor CaCBF, is associated with a homeodomain leucine zipper protein in hot pepper (*Capsicum annuum* L.). Mol. Cells 18: 300–308.
- Kim, J. 2007. Perception, transduction, and networks in cold signaling. J. Plant Biol. 50: 139–147.
- Kotak, S., M. Port, A. Ganguli, F. Bicker, and P. von Koskull-Doring. 2004. Characterization of C-terminal domains of Arabidopsis heat stress transcription factors (Hsfs) and identification of a new signature combination of plant class a Hsfs with AHA and NES motifs essential for activator function and intracellular localization, Plant J. 39: 98–112.
- Kumar, S., G. Stecher, and K. Tamura. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 fo bigger datasets. Mol Biol Evol. 33: 1870–1874.
- Li, C., Q. Chen, X. Gao, B. Qi, N. Chen, S. Xu, J. Chen, and X. Wang. 2005. AtHsfA2 modulates expression of stress responsive genes and enhances tolerance to heat and oxidative stress in Arabidopsis. Sci. China Life Sci. 48: 540–550.
- Li, H. Y., C. S. Chang, L. S. Lu, C. A. Liu, M. T. Chan, and Y. Y. Chang. 2003. Over-expression of *Arabidopsis thaliana* heat shock factor gene (AtHsfA1b) enhances chilling tolerance in transgenic tomato. Bot. Bull Acad. Sin. 44: 129–140.
- Li, P. S., T. F. Yu, G. H. He, M. Chen, Y. B. Zhou, S. C. Chai, Z. S. Xu, and Y. Z. Ma. 2014. Genome-wide analysis of the Hsf family in soybean and functional identification of *GmHsf-34* involvement in drought and heat stresses. BMC Genomics 15: 1–16.
- Liang, C., X. Liu, S. M. Yiu, and B. L. Lim. 2013. *De novo* assembly and characterization of Camelina sativa transcriptome by paired-end sequencing. BMC

Genomics 14: 1–11.

- Ling, J., W. J. Jiang, Y. Z. Hongjun Yu, Z. C. Mao, X. F. Gu, S. W. Huang, and B. Y. Xie. 2011. Genome-wide analysis of WRKY gene family in *Cucumis sativus*. BMC Genomics 12: 1–20.
- Lin, C., and M. F. Thomashow. 1992. DNA sequence analysis of a complementary of the COR15 polypeptide. Plant Physiol. 115: 171–180.
- Lin, Y. X., H. Y. Jiang, Z. X. Chu, X. L. Tang, S. W. Zhu, and B. J. Cheng. 2011. Genome-wide identification, classification and analysis of heat shock transcription factor family in maize. BMC Genomics 12: 1–14.
- Liu, J. G., Q. L. Qin, Z. Zhang, R. H. Peng, A. S. Xiong, J. M. Chen, and Q. H. Yao. 2009. OsHSF7 gene in rice, *Oryza sativa* L., encodes a transcription factor that functions as a high temperature receptive and responsive factor. BMB Rep. 42: 16– 21.
- Mare, C., E. Mazzucotelli, C. Crosatti, E. Francia, A. Michele Stanca, and L. Cattivelli.
  2004. Hv-WRKY38: a new transcription factor involved in cold-and drought-response in barley. Plant Mol. Biol. 55: 399–416.
- Mittal D., S. Chakrabarti, A. Sarkar, A. Singh, and A. Grover. 2009. Heat shock factor gene family in rice: genomic organization and transcript expression profiling in response to high temperature, low temperature and oxidative stresses. Plant Physiol. Biochem. 47: 785–795.
- Morran, S., O. Eini, B. Parent, R. Singh, A. Ismagul, S. Eliby, N. Shirley, P. Langridge, and S. Lopato. 2011. Improvement of stress tolerance of wheat and barley by modulation of expression of DREB/CBF factors. Plant Biotechnol. J. 9: 230–249.
- Motoaki, S., N. J. Mari, T. N. Ishida, F. Miki, O. Youko, K. Asako, N. Maiko, E. Akiko, S. Tetsuya, S. Masakazu, A. Kenji, T. Teruaki, Y. S. Kazuko, C. Piero, K. Jun, H.

Yoshihide, S. Kazuo. 2002. Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. Plant J. 31: 279–292.

- Mukhopadhyay, A., S. Vij, and A. K. Tyagi. 2004. Overexpression of a zinc-finger protein gene from rice confers tolerance to cold, dehydration, and salt stress in transgenic tobacco. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101: 6309–6314.
- Niu, C. F., W. Wei, Q. Y. Zhou, A. G. Tian, Y. J. Hao, W. K. Zhang, B. Ma, Q. Lin, Z. B. Zhang, J. S. Zhang, and S. Y. Chen. 2012. Wheat WRKY genes TaWRKY2 and TaWRKY19 regulate abiotic stress tolerance in transgenic arabidopsis plants. Plant, Cell and Environment 35: 1156–1170.
- Nover, L., K. Bharti, P. Doring, S.K. Mishra, A. Ganguli, and K.D. Scharf. 2001. Arabidopsis and the heat stress transcription factor world: how many heat stress transcription factors do we need? Cell Stress Chaperones 6: 177–189.
- Oh, S. K., S. Y. Yi, S. H. Yu, S. M. Jae, J. S. Moon, J. M. Park, and D. Choi. 2006. CaWRKY2, a chili pepper transcription factor, is rapidly induced by incompatible plant pathogens. Mol. Cells 22: 58–64.
- Okamuro, J. K., B. Caster, R. Villarroel, M. Van Montagu, and K. D. Jofuku. 1997. The AP2 domain of APETALA2 defines a large new family of DNA binding proteins in arabidopsis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 7076–7081.
- Qin, F., Y. Sakuma, J. Li, Q. Liu, Y. Q. Li, K. Shinizaki, and K. Yamaguchi-Shinozaki. 2004. Cloning and Functional analysis of a novel DREB1/CBF transcription factor involved in cold- responsive gene expression in *Zea mays L. Plant Cell Physiol.* 45: 1042–1052.
- Qin, F., M. Kakimoto, Y. Sakuma, K. Maruyama, Y. Osakabe, L. Tran, K. Shinozaki, and K. Yamaguchi-Shinozaki. 2007. Regulation and functional analysis of

ZmDREB2A in response to drought and heat stresses in Zea mays L. The Plant J. 50: 54–69.

- Qin, Q. L., J. G. Liu, Z. Zhang, R. H. Peng, A. S. Xiong, Q. H. Yao, and J. M. Chen. 2007. Isolation, optimization, and functional analysis of the cDNA encoding transcription factor OsDREB1B in *Oryza sativa* L. Mol. Breed. 19: 329–340.
- Qin, Y., Y Tian., and X. Liu. 2015. A wheat salinity-induced WRKY transcription factor
  TaWRKY93 confers multiple abiotic stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*.
  Biochem. Biophys. Res.Commun. 464: 428–433.
- Ramamoorthy, R. S., Y. Jiang, N. Kumar, P. N. Venkatesh, and S. Ramachandran. 2008. A comprehensive transcriptional profiling of WRKY gene family in rice under various abiotic and phytochormone treatment. Plant Cell Physiol. 49: 865–879.
- Rashid, M., G. He, G. Yang, J. Hussain, and X. Yan. 2012. AP2/ERF transcription factor in rice: genome-wide canvas and syntenic relationships between Monocots and Eudicots. Evol. Bioinf. Online 8: 321–355.
- Riechmann, J. L., and E. M. Meyerowitz. 1998. The AP2/EREBP family of plant transcription factors. Biol. Chem. 379: 633–646.
- Ross, C. A., Y. Liu, and Q. J. Shen. 2007. The WRKY gene family in rice (Oryza sativa).J. Integr. Plant Biol. 49: 827–842.
- Rushton, P. J., H. Macdonald, A. K. Huttly, C. M. Lazarus, and R. Hooley. 1995. Members of a new family of DNA-binding proteins bind to a conserved cis-element in the promoters of alpha-Amy2 genes. Plant Mol. Biol. 29: 691–702.
- Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. and Evol. 4: 406–425.
- Sakuma, Y., Q. Liu, J. G. Dubouzet, H. Abe, K. Shinozaki, and K. Yamaguchi-Shinozaki. 2002. DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of arabidopsis DREBs,

transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression, Biochem. Biophys. Res. Commun. 29: 998–1009.

- Salinas, J., G. Matassi, L. M. Montero, and G. Bernardi. 1988. Compositional compartmentalization and compositional pattern in the nuclear genomes of plants. Nucleic Acids Res. 16: 4269–4285.
- Schramm, F., J. Larkindale, E. Kiehlmann, A. Ganguli, G. Englich, E. Vierling, and P. von Koskull-Doring. 2008. A cascade of transcription factor DREB2A and heat stress transcription factor HsfA3 regulates the heat stress response of arabidopsis. Plant J. 53: 264–274.
- Seki, M., M. Narusaka, H. Abe, M. Kasuga, K. Yamaguchi-Shinozaki, P. Carninci, Y. Hayashizaki, and K. Shinozaki. 2001. Monitoring the expression pattern of 1300 Arabidopsis genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray. The Plant Cell 13: 67–72.
- Song, H., P. F. Wang, L. Hou, S. Z. Zhao, C. Z. Zhao, H. Xia, P. C. Li, Y. Zhang, X. T. Bian, and X. G. Wang. 2016. Global analysis of WRKY genes and their response to dehydration and salt stress in soybean. Front. Plant Sci. 7: 1–9.
- Song, X. M., G. F. Liu, W. K. Duan, T. K. Liu, Z. N. Huang, J. Ren, Y. Li, and X. L. Hou. 2014. Genome-wide identification, classification and expression analysis of the heat shock transcription factor family in Chinese cabbage. Mol. Genet. Genomics 289: 541–551.
- Sun, C., S. Palmqvist, H. Olsson, M. Boren, and S. Ahlandsberg. 2003. A novel WRKY transcription factor, SUSIBA2, participates in sugar signaling in barley by binding to the sugar-responsive elements of the iso1 promoter. Plant Cell 15: 2076–2092.
- Su, L. T., J. W. Li, D. Q. Liu, Y. Zhai, H. J. Zhang, X. W. Li, Q. L. Zhang, Y. Wang, and Q. Y. Wang. 2014. A novel MYB transcription factor, GmMYBJ1, from soybean



附圖七、WRKY 轉錄因子之 DNA-binding domain (DBD) 在茄科作物中胺基酸高度相似性序列,灰色填色為茄科作物高度相似性序列, 紅色方框為第一大群或第二大群特有之高度相似性序列處,黑色填色為茄科作物保守序列。



附圖八、WRKY 轉錄因子之DNA-binding domain (DBD)在雙子葉植物中胺基酸高度相似性序列,灰色填色雙子葉植物高度相似性片段, 紅色方框為第一大群或第二大群特有之高度相似性序列處,黑色填色雙子葉作物保守序列