國立臺灣師範大學生命科學系碩士論文

石櫟屬物種生理生態性狀親緣訊息

與蠟生合成基因的正向天擇

Phylogenetic signal in eco-physiological traits and signature of positive selection in wax biosynthetic genes in stone oaks (*Lithocarpus*, Fagaceae)

> 研究生:何紹瑋 Shao-Wei Ho

指導教授:廖培鈞 博士

Dr. Pei-Chun Liao

中華民國一〇五年七月

目錄

中文摘要	2
英文摘要	3
前言	4
研究材料與方法	16
結果	29
討論	41
結論	51
參考文獻	53
圖示	61
表格	68
附錄	

中文摘要

有些植物表皮細胞中的蠟生合成基因生合成蠟後,經通道蛋白運 輸至細胞外堆疊,形成物理性屏障的結晶狀(epicuticular wax crystal) 構造,常被認為與化學性防禦特徵(如:酚酸)之間有權衡關係。此外, 葉表蠟有無的適應也可能反映在蠟生合成基因及受蠟影響的生態特 徵上,如光合作用效率。本研究以石櫟屬物種作為材料,利用遺傳及 生理生態分析探討葉表蠟結晶的有/無特徵是否為適應的結果。首先 使用 6 個參考基因重建石櫟屬的親緣關係,發現距今約 1400 萬年前 至800萬年前,至少出現3次獨立由無蠟到產生蠟結晶的特徵轉換的 演化事件。在蠟骨架生合成(CER1、CER3)、調節性(CER7)、及運輸蛋 白(CER5)等基因中,僅發現 CER1 在由無蠟到產生蠟結晶的特徵轉換 時有正向天擇訊號;生理生態檢測中,蠟結晶均與酚酸及光合作用指 數無顯著相關。但 Y(II)及 δ¹⁵N 等光合作用指數在 CER1 基因樹呈現 顯著的親緣訊息,顯示光合作用效率在種間的差異反應在蠟骨架合成 的演化上。本研究推論,石櫟屬物種在中新世中期至上新世初期發生。 特徵轉換,當時劇烈的氣候變化也反映了蠟結晶生合成基因的正向天 擇及光合作用效率上。

關鍵字:功能性基因演化、親緣訊息、生理生態

2

英文摘要

The epicuticular waxes are synthesized and transported by wax-related genes in plants. The wax crystals serve as defensive traits and are considered as a trade-off between physical and chemical traits e.g. phenolic acids. Besides, the leaf epicuticular wax may be related to photosynthetic efficiency. I select stone oaks (Lithocarpus, Fagaceae) as our research materials and obtain genetic and physiological data to investigate whether the presence/absences of leaf epicuticular wax is an adaptive trait in stone oaks. The phylogenetic relationship of stone oaks reconstructed by six reference genes showed that trait shifts at least three times from noncrystalized waxy into crystalized waxy epidermis since 140 Mya to 80Mya. I sequenced and tested positive selection signals in four wax-related genes, CER1, CER3, CER5, and CER7, which are categorized as two, backbone synthetic genes, one regulatory, and one transporter genes, respectively. Signature of positive selection on CER1 at three trait transitional events of non-crystalized wax to crystalized wax imply the adaptive feature of presence of leaf epicutucular wax in Lithocarpus. The eco-physiologic analysis showed that contents of phenolic acids and photosynthetic indices are not correlated with leaf epicuticular wax, but certain photosynthetic indices, Y(II), and δ^{15} N showed significant phylogenetic signals associated with the CER1 gene tree. These results suggest the intraspecific differences of photosynthetic efficiency are response to the evolution of backbone gene. In conclusion, the trait shift events of leaf epicuticular wax in stone oaks that are inferred during the period of dramatic climate change during the Middle Miocene to Early Pliocene may be related to the positive selection of wax synthetic genes and associated with difference of photosynthetic efficiency between species.

Keywords: functional gene evolution, phylogenetic signal, eco-physiological

前言

研究計畫之背景

生物在天擇壓力下經由適應的過程中經天則篩選出遺傳、形態或 調節基因的表現量等特徵以增加自身,或提高族群生存與繁殖的機會。 陸生植物在適應陸生環境的過程中得適應諸多環境因子的變化,包括: 乾濕度、高低溫、地表重力、曝露在紫外線環境中之程度。其中在陸 生環境中最重要的適應特徵是在逐漸乾燥的環境中仍保持植物體內 水分的能力,在這樣的環境壓力下植物在表面發展出具疏水性的表層 防止體內水分藉由氣孔以外的通道散逸,這樣的特徵被認為是植物演 化歷史上的重要特徵(Yeats & Rose, 2013)。隨著植物表皮的形成,演 化出許多與水分相關的適應策略,例如:在缺水的環境的適應(Ogburn & Edwards, 2010)。為此,植物表皮的生合成機制便成為科學家研究 探討的對象,而其中表皮蠟生合成扮演重要的角色(Samuels *et al.*, 2008)。

葉表面蠟對於植物生理生態之簡介與對於適應演化的影響

植物葉表包含蠟結晶的許多特徵,例如:厚表皮、氣孔、細毛等 構造是反映古生物適應古環境下演化出的構造,這些構造時常與乾燥 氣候有所關聯,因此被稱作旱性特徵(xeromorphic features),是古地質 學中用以判斷環境乾濕降雨程度的指標之一(Haworth & McElwain, 2008);Hill (1998) 廣義定義若植物生理構造中能夠達到減少水分蒸散 的功能即稱作旱性特徵。其中葉表蠟結晶的分布、在葉表上的厚度、 結晶的形式(脂肪酸鏈的組成型式)均影響到非氣孔(non-stomatal)水分 蒸散效率,對於植物適應乾旱的環境扮演重要的角色(Monneveux & Belhassen, 1996)。部分的研究指出蠟質在葉表的分布是受到光線的誘 發所導致(Giese, 1975; Jenks et al., 1994), 光線的照射會影響脂肪酸鏈 的長度以及促進葉表蠟生合成的速率(Giese, 1975),但整體機制與葉 表面蠟質的分布形式上未被通盤釐清(Kunst & Samuels, 2003)。葉表 蠟同時作為葉組織的天然屏障,阻擋並抵抗許多物理性或生物性危害 但同時也影響到光合作用的效率, Holmes and Keiller (2002)在比較四 個物種的葉表蠟發現蠟質葉容易反射造成細胞内 DNA 損傷之 UV 波 段(330 nm),但同時也反射光反應之吸收波段(680 nm),顯示葉表蠟 在光合作用效率上的影響,早期的研究更指出當表面蠟質被移除之後 UV-B 就會大量被表皮組織所吸收(Mulroy, 1979), 進而造成不可逆的 損傷;葉表蠟也會改變物體沾附於葉表的能力,有效減少害蟲與微生 物沾粘,减少其族群數,作為抵禦生物因子傷害的屏障(Müller, 2006), 降低病原菌入侵與組織破壞。此外由於非氣孔蒸散會減少卡爾文循環 中二氧化碳固定的效率(Blum, 2009),而在許多研究中指出,植物葉

表蠟的分布多寡會影響水分經由非氣孔蒸散的多寡,進而影響二氧化 碳固定率及光合作用效率(Kerstiens, 2006)。一般而言水分使用效率 (water use efficeincy, WUE,即淨光合作用/蒸散作用)可用以反映植物 透過氣孔固定大氣中二氧化碳程度的一個數值,常以碳穩定同位素的 二氧化碳偏好;就兩者的特質而言,由於¹²CO2較¹³CO2少一個中子, 所以在光合作用通過氣孔的 CO2 為較容易通過氣孔的 ¹²CO2; 在固碳 作用進行同時,Rubisco 會較易與¹²CO2結合,也因此植物體內的¹³C 會較大氣中的含量較低,而上述的選擇偏好常會反映在不同的物種之 間,例如:C3 植物相較於 C4 及 CAM 植物而言,植物組織內會有較 低含量的 ¹³C 組成(δ¹³C 分別為 C3: 21‰-35‰, C4: 10‰-14‰, CAM: 10‰-20‰);或植物所適應的海拔、溫溼度等生態差異,例如高海拔 有相對較較低溼度目¹²CO2分壓較低,所以生理狀態與低海拔溼度較 高的環境相比會有不同的光合作用效率,常被使用為海拔差異下,度 量光合作用效率的指標之一(Farquhar *et al.*, 1989; Perez-Harguindeguy et al., 2013) •

在抵抗植食動物中,植物的葉片演化出許多不同的防禦特徵,這些特徵可大致被歸類為:物理性防禦及化學性防禦,兩者皆被視為植物的直接防禦(direct defense)(Furstenberg-Hagg et al., 2013)。葉片對抗

昆蟲的物理性防禦為在葉表皮演化出如蠟質膜(wax film)、蠟結晶、細 毛等構造,或是增加其厚度及韌度,讓昆蟲在進食時受到阻礙,或是 减少沾黏性,降低昆蟲在葉中拓殖的族群(Müller, 2006);大部分維管 束植物葉片的角質層(cuticle)上均覆蓋各種形式的蠟質膜或是蠟結晶, 一般而言植物葉表蠟的物理化學特性,如各式脂肪酸鏈的多寡、型式 以及蠟在葉表上分布的方式隨著物種以及當地的溫度環境而有所變 異(Schaller, 2008);部分葉表皮特化出的細毛(trichome)或是刺狀物本 身也用於抵禦草食動物以及昆蟲(Myers, 1991; Fordyce & Agrawal, 2001; Schaller, 2008)。葉片內之生物性化學防禦主要是藉由植物的次 級代謝物的生合成途徑所產生的許多生化合物 (biochemical compounds),有時又被稱作天然物(nature products)(Rattan, 2010; Furstenberg-Hagg et al., 2013), 用以對抗大部分的昆蟲(Fraenkel, 1959), 少數不同物種間各式的生化合物演化出許多對抗特定專食性昆蟲的 化學物質,其主要直接影響到專食性昆蟲的消化道與生理功能 (Engelberth, 2006; Rosenthal & Berenbaum, 2012), 主要的化合物為酚 化合物(Phenolics),包含一般熟知的酚酸(Phenolic acids)、丹寧(Tannins) 以及萜類(Terpenoids)等。酚化合物主要透過抑制植食性昆蟲的酵素活 性達到驅忌的效果(Cheeke, 1989),在櫟屬物種 Quercus oleoides 就發 現特定的多酚類及單寧與抵抗植食性昆蟲之間具有相關性

(Moctezuma *et al.*, 2014)。植物葉片物理與化學防禦策略的權衡(tradeoff)機制一直以來是演化上的重要議題之一,其影響到植物體本身的 適存度,研究其防禦策略有助於理解植物本身適應不同的生物環境壓 力下的過程(Agrawal, 2007; Campbell & Kessler, 2013; Moles *et al.*, 2013)。

葉表面蠟質的各種形態除了在不同環境中扮演重要功能外,在形 態上也被作為物種間鑑別與分類的特徵,Barthlott et al. (1998)依據表 皮蠟在葉表面上形成的結晶形狀,將13000 種種子植物分成 23 種結 晶形式。綜合上述,葉表面蠟構造的形成與覆蓋表面的形式對於植物 的生存、適應極端環境、對抗逆境等具有重要的功能(Reina-Pinto & Yephremov, 2009),也因此探究葉表面蠟生合成的演化機制在物種適 應環境與植物分類上都是十分重要的課題。

葉表面蠟的生合成、調控、運輸基因之簡介

植物葉表蠟的生合成主要經由葉表皮細胞參與其中(Samuels et al., 2008),過程分為幾個重要的生合成途徑:將 C₂為主的 building blocks 鍵結形成 C₁₆ 或 C₁₈ 的脂肪酸,再經由內質網中酵素的催化下 聚合 C₂₀-C₃₄ 的 very-long-chain-fatty-acids (VLCFAs), VLCFAs 再經相 關生合成酵素修飾與調節下最後形成蠟質產物(Samuels et al., 2008)。

Samuels et al. (2008)依據生合成過程中扮演的功能,將參與的基因大 致分成(1)骨架生合成:參與 VLCFAs 上游脂肪酸鏈骨架生合成以及 後續 primary alcohol pathway、alkane pathway 等下游參與氧化還原反 應並加上特定官能基之基因;(2)脂肪酸鏈產物之運輸:將細胞質中生 成的脂肪酸鏈藉由膜上 ABC transporter 主動運輸至表皮細胞的膜外; (3)基因調節:部分基因直接或間接調控某個骨架生合成酵素的反應 速率與活性。

近年在阿拉伯芥(Arabidopsis; Brassicaceae)的研究中指出:植物蠟 生合成相關基因的表現量增加,反映出水逆境或乾旱逆境時環境變化 所誘導出的表現量增加,目的是為了調節水分在植物體內的含量 (Kannangara et al., 2007; Samuels et al., 2008; Kosma et al., 2009; Bourdenx et al., 2011),顯示蠟相關生合成基因在植物逆境時扮演十分 重要的功能。此外在基因表現的蛋白質功能也於近十年被證實,例如: cer5 (cer: eceriferum,指不含蠟的突變基因)在阿拉伯芥模式中被發現 體表的蠟少於野生型,經 Pighin et al. (2004)研究指出 CER5 是某種通 道蛋白,突變後使蠟主動運輸到膜外的量減少,使之呈現與野生型不 同的形態特徵。另外在蠟相關生合成基因的調控方面的研究中,其中 一個交互作用是 CER3 與 CER7 兩基因的交互作用的模型也以實驗證 實,顯示在阿拉伯芥中 CER7 ribonuclease 的活性決定了 CER3 (蠟骨 架生合成基因)之活性(Lam et al., 2012)。

葉表面蠟含量的多寡或有無的形態反映在蛋白質上的改變,使得 酵素的活性在種間有所差異,造成形態上的不同。Samuels et al. (2008) 整理前人的研究中也發現有部分基因若失去部分或完全的功能,突變 型在形態上則影響莖表面和葉表面,相較於野生型在蠟含量的比較上 有10%-85%不等的差異;另一推論是由於基因表現上的有無,同樣會 在形態上發生改變,如上述提到的 CER7 (Hooker et al., 2007)。在 Koenig et al. (2013)對於番茄轉錄組進行分析,其中比較兩種原生於不 同環境的番茄的研究中發現:許多蠟生合成相關基因,包括:CER1、 CER2、CER3、CER4、CER5-like、CER6、CER7、CER10、WIN1 等 基因在種間具有表現量上之差異,而這般差異被推測是不同環境適應 下演化的結果。Dodd and Afzal-Rafii (2000)在研究三種不同原生環境 的 柏 科 物 種 (Austrocedrus chilensis, Fitzroya cupressoides, Pilgerodendron uviferm),將三物種的不同地理區代表不同族群的個體 種植在 common garden 三年後,比較其組成蠟的重要有機物烷烴 (alkane, 又稱作石蠟烴)的碳數(介於 C_{21} - C_{38})與地理區的關係,發現 A. *chilensis、P. uviferum* 兩物種在不同的地理區其族群的烷烴生合成的 碳數與所代表的棲地呈正相關,並推論生合成蠟的主要有機物烷烴是 由於族群間各自適應不同的棲地環境而演化利用出不同碳數的烷烴,

Dodd and Afzal-Rafii (2000)並推論可能是由於降雨、氣溫等環境因子 產生不同的演化壓力。而蠟的生合成又是防止葉片水分散失的重要特 徵,也能夠解釋此推論。

研究材料之簡介:石櫟屬(Lithocarpus, Fagaceae)

欲探討蠟生合成對於植物適應上的演化議題, 殼斗科石櫟屬 (Lithocarpus, Fagaceae)植物經長時間適應不同環境下演化出許多物種, 其物種廣泛分布於東南亞、中國大陸、台灣、日本九州、菲律賓群島、 新幾內亞婆羅洲、爪哇島等地(Liao, 1996; Huang et al., 1999)。生長於 熱帶、亞熱帶與溫帶地區,是東亞地區低中海拔森林的優勢樹種,因 此適合探討環境壓力下,功能性基因受天擇分化與適應的議題。遺傳 方面,過去石櫟屬於殼斗科的親緣關係處理上,早期 Nixon and Crepet (1989)以殼斗科的殼斗(cupule)上的特徵,諸如殼斗上的瓦片的排列構 造與模式,以及殼斗科各屬間的傳粉特徵(pollination syndrome),例如 傳播媒介為風媒抑或蟲媒作為分類依據,並以這些特徵推論殼斗科屬 間的演化模式,在於此分類處理下,櫟屬(Quercus)被處理成特徵為 epigeous fruit 與風媒的 Fagaoideae, 栗屬(Castanea)與石櫟屬 (Lithocarpus)具 hypogenous fruit 與蟲媒為特徵的 Castaneoideae, 兩者 依據特徵演化被歸為不同的亞科。

近年來以分子技術處理物種間乃至於屬間親緣關係中,選用不同的分子標記所推論的親緣關係可能不一致,進而影響到後續的演化推論及分析結果,如分歧時間等。Manos et al. (2001)使用核醣體 DNA 片段以及 ITS (internal transcribed spacers)片段並結合 Manos and Steele (1997)當初所使用的葉綠體 matK 片段與核醣體 DNA 的 ITS 片段以 MP 法重建親緣關係,結果無法排除石櫟屬、櫟屬與栗屬 3 屬的親緣關係。爾後 Oh and Manos (2008)透過花部發育相關基因 CRC (CRABS CLAW)的序列重建親緣關係,ML 法重建的結果則顯示櫟屬與栗屬有較近的親緣關係,石櫟屬則是相較於外群的位置;同樣的 Manos et al. (2008)結合 CRC、ITS、cpDNA 做出相同的推論。

由不同形態特徵及分子標記所推論出不同的親緣關係,可能是因 基因演化與種化的時間不同,導致利用化石定年藉此推論石櫟屬種化 時間的分子鐘定年方式產生不確定性,為此本實驗希望針對這個部分 設計實驗驗證殼斗科內石櫟屬、櫟屬、栗屬與山毛櫸屬(Fagus)之間的 關係,藉此釐清石櫟屬的歸群關係與了解其種化時間,在擁有遺傳資 訊的情況下,以便日後挑選石櫟屬材料進一步驗證蠟結晶特徵的適應 演化模式。

蠟形態分類上, Zhou and Xia (2012)利用掃描式電子顯微鏡觀察中國及台灣產石櫟屬植物乾燥標本共 52 具標本,歸納出葉表面蠟結

晶的有無的特徵,認為此特徵穩定存在石檪屬物種中,可作為分類的 依據。Deng et al. (2013)則以掃描式電子顯微鏡觀察 111 種石檪屬乾 燥標本,並進行分類上不同於 Zhou and Xia (2012)的處理是依據結晶 表面的形狀與複雜程度做分類處理(Barthlott et al., 1998),也獲得了蠟 表面結晶的資訊。因此在分類上可以前人處理乾燥標本的形態特徵做 為參考。台大實驗林楊智凱先生日前也以掃描式電子顯微鏡觀察台灣 產石檪屬蠟之形態,取新鮮成熟葉之上表皮及下表皮,發現部分物種 在下表皮氣孔周圍覆蓋一層蠟,而部分則無(私人通訊),其形態差異 與適應環境的關係尚待釐清。但推測造成葉下表皮蠟塊有無差異的成 因可能是植物於特定環境的長期適應下,對於水分調節機制的不同所 演化出的結果(Waters, 2003)。石檪屬樹種葉下表面蠟結晶的功能、生 合成基因的演化與環境因子的關聯性尚待研究與釐清。

欲解決之問題

本研究將以台灣產石櫟屬為研究材料,根據楊智凱先生透過掃描 式電子顯微鏡觀察葉下表面蠟有無為特徵,研究這些特徵差異的原因, 以釐清天擇壓力是否與形態變異有相關性。本研究欲以三個層面探討 天擇對於葉表面蠟特徵之影響,分別由:(1)首先釐清石櫟屬、櫟屬、 栗屬與山毛櫸屬四者屬間的親緣關係,以選擇適合石櫟屬的外群、(2) 蠟結晶生合成之目標基因的遺傳變異、(3)蠟結晶影響之生理生態差 異進行研究與討論。以基因在生合成的三大功能為標的,取4個候選 基因作為物種間探討遺傳變異的研究;檢測蠟結晶生合成基因是否受 到天擇,而天擇是發生在什麼時候,有無特定的胺基酸位點受到天擇 的作用?最後透過生理生態的數據及楊智凱先生提供的形態資料與 生理生態變異的資料,包含台灣產石櫟屬14個物種之葉片的光合作 用效率、水分利用效率以及酚酸化合物之組成與比例,藉以了解葉表 面蠟的有/無在石櫟屬物種間造成生理生態上的影響,以釐清石櫟屬 蠟相關生合成基因之演化,以及了解蠟生合成相關基因在適應上的角 色。

研究假說

針對上述文獻回顧,推測現今觀察到的石櫟屬蠟結晶特徵,可能 是蠟結晶生合成基因受到正向天擇的篩選,適應後的結果;而正向天 擇可能來自於當時的環境壓力,並推測這樣的壓力也會反映在與蠟多 寡有關的植物生理特徵上,因此針對這些推測,做出以下假說: (1)正向天擇發生在蠟結晶特徵態(有結晶、無結晶)轉換的過程中,本 研究以 4 個蠟生合成基因作為檢測的基因;若天擇是發生在蠟結

晶特徵態轉換的過程中,那應該會在蠟生合成基因上檢測到正向

天擇的訊號。

(2)防禦權衡假說: 蠟結晶被視為一種物理性防禦,若投資於防禦的資源是一樣的情況下,物種間使用物理性防禦或化學性防禦會產生權衡的情況,若石櫟屬在抗蟲害與微生物的防禦策略是兩者間權衡的結果,那應該會發現兩防禦策略相關的數值會呈現負相關。
(3) 蠟結晶影響光合作用效率假說:可能受到蠟結晶影響的生理生態性狀,或許會反映在與蠟結晶有關的生合成基因上,若能以基因的演化關係預測物種間生理生態性狀的相似性(ecological similarity),那就能間接說明兩者間的關連性,例如反映在光合作用效率相關的生理生態性狀上。

研究材料與方法

本研究主要以台灣產石櫟屬作為有蠟/無蠟之物種間研究,經楊 智凱先生以 SEM (scanning electron microscope)檢視葉表形態,由楊智 凱先生歸納成 8 種有蠟結晶特徵的物種與 6 種無蠟結晶特徵的物種 (表一),進行遺傳檢測及生理生態實驗。

DNA 萃取

葉片樣本於採集地採集後立即放於矽膠中乾燥保存,並乾燥於 4°C冰箱保存。萃取方式參考 Doyle and Doyle (1987)之 CTAB 法,並 修改部分藥品比例以解決 DNA 中夾雜多醣類沉澱的問題,詳細方法 詳見附錄一。

RNA 萃取

葉片標本於採集地採集後立即放於 1.75 毫升之 RNAguardian solution (MBGEN bioscience, Taipei City, Taiwan)中以 1:10 (葉片:溶液) 的比例進行4°C至於冰盒中保存,並於一天內帶回實驗室-80°C保存, 避免 RNA 降解。RNA 萃取法的前處理參考 Gambino *et al.* (2008)以 CTAB lysis buffer 處理醣類與多酚類的問題,之後則以 TRIzol (Life Technologies Corp., California, USA)法移除 gDNA,詳細方法詳見附錄

分子技術

- o

PCR 使用 10-100ng 之 DNA 模板、0.5-1U 的 Taq (Bernardo Scientific Corp., Taipei) > 100 mM deoxyribonucleotide triphosphate (dNTP)、每一引子濃度 0.2 mM; PCR 機器設定 94℃ 時間 3 分鐘將 DNA 雙股螺旋解開,接著開始 35 次循環:94°C 時間 35 秒鐘、設定 黏合溫度(詳見附錄二的Tm值)時間35秒鐘、72℃時間3分鐘、最 後 72℃ 時間 10 分鐘使 Taq 反應完全後放-20℃ 保存。共使用 6 個中 性核基因,分別是 FAD (Fatty acid desaturase)、 CAP (Cytosol aminopeptidase) · SAM (S-adenosylmethionine synthase) · SAHH (S-Adenosyl-L-Homocysteine Hydrolase) • ESRK (Mitogen-activated protein kinase 3)、dGd (Digalactosyldiacylglycerol synthase)的引子對(附錄三), 引子最佳的 Tm 值分別列於附錄三。PCR 後的產物經 ExoSAP-IT (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) 純化去除多餘的 dNTP 後,純化後的產物利用 ABI BigDye 3.1 Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)進行雙向定 序。序列上之遺傳多型性(polymorphism)以 ABI PRISMH® 3730XL DNA Sequencer (Perkin-Elmer, Foster City, CA, USA)進行視覺化的呈 現。當序列中有 ambiguous 的鹼基對,則以 yT&A cloning kit (Yeastern Biotech, Taipei, Taiwan)進行選殖,最後再以 M13F 及 M13R 引子做定 序,藉由基因選殖的方式區分同一個 PCR 產物內的異型合子(詳細選 殖過程參考 RBC TA Cloning Vector Kit Protocol Book (Real Biotech Corporation, New Taipei City, Taiwan))。序列雙向的拼接使用 DNASTAR ver. 7.0 (Lasergene, Germany)中的 SeqMan 判斷。藉由 Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool program 尋找 Castanea mollissima 基因組(accession number: ASM76360v1)、The Hardwood Genomics Project server (http://www.hardwoodgenomics.org/); Quercus Portal (https://w3.pierroton.inra.fr/QuercusPortal/) 的 Quercus robur (Quercus robur assembly v1);以及 The one thousand plants project (1KP) 資料庫(https://www.bioinfodata.org/Blast4OneKP/)內的殼斗科物種 (Fagus sylvatica, sample number: SVVG; Quercus shumardii, sample mumber: HENI; C. pumila, Sample number: UZWG; C. crenata, sample number: NHUA)中的資料庫確認基因的同源性(orthologous)與選擇合 · 適的外群,此外也利用同源性基因做引子的設計。

石櫟屬之親緣關係重建

殼斗科屬間的親緣關係的釐清使用 1KP 資料庫(Matasci *et al.*,
2014)及 Quercus Portal 資料庫(https://w3.pierroton.inra.fr/QuercusPortal)

中的山毛櫸屬一種(F. sylvatica)、櫟屬兩種(Q. shumardii,、Q. robur)、 栗屬兩種(C. pumila、C. crenata)及石櫟屬兩種(L. hanceii、L. shinsuiensis;本實驗室資料)進行親緣關係的重建以及屬間分化時間 之推估。以三斗石櫟與浸水營石櫟的轉錄組資料分析之 50 個 unigenes 做為候選基因 BLAST 資料庫上之同源基因(詳列於表二);分子鐘的 設定使用 lognormal relaxed molecular model 並以殼斗科化石出現的時 間約距今1億年前,以及櫟屬、栗屬這兩屬的分岐時間為距今6000 萬年前做為分子鐘的參考點(Manos & Stanford, 2001),以 Yule's speciation model 做為種化模型;利用 Markov chain Monte Carlo (MCMC)方式搜尋最適 prior 及 likelihood 值並推估事後機率,進行 10 億次模擬分子鐘的設定,每1萬次模擬取樣一次,並刪除前10%樣本 (burn-in); 模擬結果利用 TRACER ver. 1.6 (Rambaut et al., 2014)進行 統整;最後利用 TreeAnnotator ver. 1.6.1 (Drummond et al., 2012)合併 取樣的樹及使用 FigTree ver. 1.4.2 (Rambaut, 2015)呈現最終的歸群結 果(樹型與分支支持度),藉此釐清4屬間的親緣關係並選定合適的外 群進行物種間親緣關係的重建,重建的過程中以 F. sylvatica 為石櫟 屬、櫟屬、栗屬三屬的外群。

在篩選 50 個同源基因的過程,挑選屬內歸群結果清楚且中性演 化的同源基因,以利用三種重建親緣關係的方法進行初步確認,分別

為: (1) MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0) (Tamura et al., 2013)內的距離法 neighbor-joining (NJ)重建 6 個中性基 因做的基因樹,在 NJ 樹的重建裡,核苷酸的置換使用 maximum composite likelihood model,以 pairwise deletions 的方式處理序列之間 gap 的位置,以 1000 次 bootstrap 做為分群之間支持度的衡量; (2)以 likelihood-based 法的 maximum likelihood (ML),以 PhyML (Guindon et al., 2010) 進行分析, 並由 PhyML 線上伺服器(http://www.atgcmontpellier.fr/phyml/)協助運算, substition model 是透過 MEGA 的 Maximum Composite Likelihood Method 檢測出的核苷酸置換模型、 tree searching 以 Nearest Neighbor Interchanges (NNI)、Branch support 以 approximate likelihood-ratio test (aLRT)方式進行評估; (3)以 Bayesian inference 的方法重建親緣關係,利用 MrBayes 3.2 (Ronquist et al., 2012)模擬 1 千萬次並 burn-in 前 10%的樣本, 使兩個獨立模擬 達到收斂(在模擬2萬次後, split frequencies<0.01), 最後取得共識樹。

欲進行物種間的親緣關係重建,本研究經由 1KP 資料庫下載中 性基因座 CAP 外群的序列: F. sylvatica (SVVG-2002227)、Q. robur (scaffold_5104)及 C. mollissima (KN214271.1); DGD 序列: F. sylvatica (SVVG-2000226)、Q. robur (scaffold_2284)及 C. mollissima (KN215088.1); ESRK 序列: F. sylvatica (SVVG-2007983)、Q. robur

(scaffold_285)及 C. mollissima (KN214334.1); FAD 序列: F. sylvatica (SVVG-2009588) 、 *Q. robur* (scaffold 439) 及 *C. mollissima* (KN215717.1); SAHH 序列: F. sylvatica (SVVG-2072951)、Q. robur (scaffold_2247)及 C. mollissima (KN214284.1); SAM 序列: F. sylvatica (SVVG-2009430) 、 Q. robur (scaffold_7706) 及 C. mollissima (KN215497.1)。序列排序(sequence alignment)利用 Clustal W (Thompson et al., 1997)處理排列與 gap, 並以 BioEdit 協助手動校對序 列(Hall, 1999)。物種樹的重建以 BEAST ver. 1.8.2 (Drummond et al., 2012)内的 BEAST (Heled & Drummond, 2010)重建;核苷酸的置换模 型以 AIC 及 BIC 的數值做為模型選擇; 定年時間參考點(calibration) poits)利用上述重建的親緣關係所推論出的山毛櫸屬、及櫟屬與栗屬 推論出的分歧時間點為分子定年之參考點,重建含台灣產石櫟屬 14 個物種、外群各3個物種(C. mollissima, Q. shumardii, F. sylvatica)共17 個 OTUs (operational taxonomic units)進行親緣關係的重建並推估分歧 時間,在後續分析中,以 F. sylvatica 則為石櫟屬、櫟屬、與栗屬的外 群。

目標基因演化關係的重建分別以上述 NJ、ML、BI 的方法進行, 將不同異型合子的序列做為獨立的 OTU 進行分析(圖六);另外為了 進行親緣訊息的分析,利用 BEAST 法重建物種的基因樹(圖七),重 建後的 phylogram 將用以後續親緣訊息分析中的樹型。

石櫟屬種間光合作用效率之量測

葉片光合作用效率高低係以光系統 Ⅱ 之光化學產率 (photochemical yield, Y (II)) 作為衡量,利用 MINI-PAM-II Photosynthesis Yield Analyzer (Heinz Walz GmbH, Germany)測量光化 學產率計算,利用葉夾固定出 5mm 範圍的同心圓,經由光纖管線打 出飽和光之後,測量葉片所吸收並誘導出最大的光吸收產能(maximal fluorescence yield, Fm), 並計算其變化量(ΔF), 由於此吸收參數 (YIELD-parameter, $\Delta F/Fm$)與葉片的光合作用效率有相關性,因此儀 器藉此將所測得之數值進行換算。為避免生長環境光照差異產生光吸 收的差異,因此使用的14種材料皆在官蘭福山植物園;每一物種各 取四個方位(東、西、南、北)的葉片各5片,避免因日照位置所造成 光合作用效率的差異,測量前先以二次水(ddH₂O)輕輕擦拭葉上表面 去除黏附之蘚苔類與直菌以避免測量到非葉片組織產生的光吸收產 能;每片在測量時避開中間主脈處,利用葉夾夾取葉片的基部、中間 以及先端三個部位,最後平均測量到的數值作為平均一片葉子的光吸 收產能。

台灣產石櫟屬種間水使用(WUE)效率之分析與碳氦同位素之測量

為避免生長環境的溫溼度差異造成葉片蒸散效率的差異,故實驗 環境選擇栽種於宜蘭福山植物園之 14 個台灣產石櫟屬物種。每物種 各取四個方位之葉片若干置於烘箱 50°C 乾燥處理,將乾燥的葉片以 液態氮研磨成粉末後,取 0.1 毫克完全乾燥後保存於錫囊(tin capsules) 中送至 SGS 分析公司分析 δ¹³C、δ¹⁵N 穩定同位素及碳、氮含量比。

檢測功能性基因受天擇影響的位點

將密碼子上核苷酸置換率(K)分為非同義置換(Ka,核苷酸置換會 造成胺基酸改變)及同義置換(Ks,核苷酸置换不會造成胺基酸改變), 而 ω 值(nonsynonymous substitutions rate/synonymous substitutions rate, Ka/Ks)則是用以推論天擇方向的指標,ω>1表示 Ka 較 Ks 快,天擇傾 向保留變異的胺基酸位點而非保留同義置換,是為正向天擇;反之 ω<1 為淨化天擇(purifying selection);而突變隨機發生的變異則會使 得 ω=1,為中性演化。首先比較 6 個參考基因(reference genes)與目標 基因(target genes, 4 個蠟相關生合成基因)在石櫟屬物種中 K 的快慢 進行比較。首先比較目標基因 K 值與參考基因的 K 值,以參考基因 為基準,比較目標基因之間的 K 是否在核苷酸置換上的模式是否有 所不同;其次是比較目標基因的 Ks 值與參考基因的 K 值(由於參考基 因大多為基因上非編碼區,故視總 K 為 Ks),比較在不考慮 Ka 的情 況下, Ks 的大小;最後比較目標基因的 Ka 與目標基因的 Ks,探討 蠟結晶生合成基因是中性演化或受到天擇。

利用 PAML ver. 4 (Yang, 2007)中的 site model 檢測功能性基因上 受到天擇的位點, Site model 中有兩種不同的假設: (1)虛無假設模型 中不允許胺基酸位點的 $\omega > 1$ (M1a, neutral model)以及(2)對立假設中 分許胺基酸位點 ω>1 (M2a, selection model);以及根據這個基礎下考 盧序列的異質性的的中性模型(M7, M8a)及天擇模型(M8),利用 likelihood-based 的方式計算各別模型的 likelihood 值,分析使用的樹 為中性基因座重建之物種樹,以 likelihood ratio test (LRT) 進行統計檢 測(Nielsen & Yang, 1998),計算 2ΔL 所對應到的卡方分布中是否顯著 (p<0.05),推論何種模型為較佳的演化情境,最後再利用 Bayesian Empirical Bayes (BEB)分析 $\omega > 1$ 的位點的機率多少,找出可能潛在 $\omega > 1$ 的胺基酸位點,並進而推論正向天擇可能作用在那些特定的胺基 酸位點上。PAML 之中的 branch model 則是檢測特定有興趣的演化分 支(foreground branch)是否有 $\omega>1$,虛無假設模型(M0)是假設演化的過 程中的每個分支僅有一種演化速率且不允許 $\omega > 1$,而對立假設則(M2) 是允許其中一些分支(foreground branch)在演化的過程中 $\omega > 1$ 的情況 發生,而另一些分支(background)則不允許 $\omega > 1$ 的情境發生。最後同 樣利用LRT檢測,比較對立假設是否拒絕虛無假設,檢測出 foreground branch 是否為 $\omega > 1$ 。最後則檢測特定演化分支(foreground)中的特定胺基酸位點是否有 $\omega > 1$ 的位點存在(branch-site model),比較虛無假設(modified model A, fix $\omega = 1$)模型與對立假設模型(model A, 胺基酸位點之 ω 可分成若干群,且允許 foreground 中的特定位點之 $\omega > 1$ 的情況發生),最後同樣利用 LRT 檢測是否對立假設顯著優於虛無假設(p<0.05),並以 BEB 方式得知 $\omega > 1$ 的事後機率。

在 PAML 的 branch model 的檢測上,實驗假設在特徵獨立轉換 的演化分支(檢測中設定為 foreground)中,有與背景不同的演化速率 存在,代表在特徵轉換的過程中與未轉換的演化事件相比有不同的選 汰壓力(selective pressure),因此允許 foreground 為另一個演化速率且 允許其 ω >1。若上述的演化情境成立(拒絕 constant model, M0),代表 特徵演化的過程的確受到不同的選汰壓力,接下來則要進一步檢測, foreground 的 ω 與背景的 ω 不同,究竟是因為(1)受到正向天擇,或 是(2)只是從選汰壓力中釋放(relaxation of selective pressure);這時要 與中性演化下的情境相比,若在特徵轉換的過程中,是發生中性演化, 則 foreground 的 ω =1,將中性的演化情境做為虛無假設,與受到正向 天擇的演化情境(允許 foreground 的 ω >1)進行假說檢定。若(1)拒絕虛 無假設,則代表拒絕中性演化,在特徵轉換的過程中,foreground 檢 測到正向天擇的訊號;若(2)無法拒絕虛無假設,則表示在特徵轉換的 過程中,僅反映出該分支與背景相比,從選汰壓力中釋放。

由於基因會受到重組的影響,使得原本受到天擇作用的位點提高 異型合子率,也在LRT 時產生 false positive (Anisimova et al., 2003), 故利用 HyPhy (by webserver DATAMONKEY)(Pond & Frost, 2005; Pond et al., 2005; Delport et al., 2010)中的 GARD recombination analysis (Pond et al., 2006)進行序列上可能造成重組的 breakpoint,將轉置後的 序列重新構樹,將原本的基因樹與校正重組後重建的 GARD 推論樹 (GARD inferred tree) 做樹型分析(topological test),若 KH-test (Shimodaira & Hasegawa, 1999)檢測的結果為 GARD 推論樹拒絕原始 基因樹的話,那就應該考慮基因演化中有發生重組的可能性。藉由考 慮重組造成的演化歷史,透過校正序列中可能發生重組的區域,重新 建構物種間基因的演化樹(GARD 推論樹);透過 REL、FUBAR 兩個 site model 及 MEME 一個 branch-site model 的方法檢測可能有 $\omega > 1$ 的 位點及演化分支。

生理生態數值之分析與親緣訊息的檢測

所獲得的生理生態數值與有蠟/無蠟的特徵進行邏輯迴歸,了解 蠟結晶性狀的有/無作為物理性防禦與酚酸作為化學性防禦兩者間是 否有權衡關係,以驗證假說(2);另外同時檢測蠟結晶的有/無性狀是 否與光合作用效率的多寡有關,透過兩者的關連性以驗證假說(3)。

另外透過基因的演化或是物種的演化,預測性狀特徵的相似性, 便可以得知基因所對應的性狀或所影響的生理性狀之間的關連性,所 使用的方法是透過親緣訊息(phylogenetic signal)的方法檢測,若演化 樹呈現的演化關係可以預測生態性狀上的相似性,則代表其中有親緣 訊息存在,也代表兩者間有關聯性。其中 Moran's I (Moran, 1950)、 Abouheif 's C_{mean} (Abouheif, 1999)都是 correlation-based 的方法得知物 種間的演化關係(歸群方式或遺傳距離)或基因間的演化關係與生態 性狀間的關連性。若 I=0,則表示演化樹上的 OTU 歸群結果,是符合 隨機分布模式;若 I<0,則表示演化樹上的 OTU 歸群的結果,不符合 隨機下的分布模式,OTU 在演化樹上的分布是隨機分散的;若 I>0, 則表示彼此歸群較近的 OTU,其特徵就越相似。由於 Cmean 的運算是 根據 Moran's I 的基礎,同樣為 spatial autocorrelation 的運算方式,所 以數值的解讀同 I 值(Munkemuller et al., 2012)。Blomberg's K (Blomberg et al., 2003)則是 model based 方法,藉由親緣關係預測生態 性狀間的相似程度;首先檢測 K 值是否顯著偏離零(K=0 表示無親緣 訊息),若顯著偏離零則表示有親緣訊息;接下來若顯著偏離零且K=1, 則代表有強烈的親緣訊息且特徵的演化是根據 Brownian motion

model of evolution; *K*>1,表示近緣的 OTU 其特徵相似的程度遠超過 Brownian motion model of trait evolution 預期(Kamilar & Cooper, 2013)。 上述親緣訊息分析,使用 picante (Kembel *et al.*, 2010)、ape (Paradis *et al.*, 2004)、adephylo (Jombart *et al.*, 2010)、ade4 (Dray & Dufour, 2007)、 phylobase (Hackathon *et al.*, 2011)、geiger (Harmon *et al.*, 2008)、phytools (Revell, 2012)套件,利用 R (R Core Team, 2013)進行運算。



殼斗科科內屬間(山毛櫸屬、栗屬、櫟屬、石櫟屬)親緣關係之重建

因形態歸群及過去以分子方式所獲得的石櫟屬、櫟屬、栗屬的演 化關係假說不一致,故為了判斷石櫟屬最有可能的姊妹屬作為外群, 我挑選資料庫中 50 個同源基因進行屬內的親緣關係分析,以判斷石 櫟屬最有可能的姊妹群。分析資料庫中 50 個對應至阿拉伯芥 (Arabidopsis thaliana)的同源基因,利用 NJ 法、ML 法以及 BI 法進行 親緣關係的重建(詳細的參數設定與 modeltest 的結果列於表三);其中 有 25 個基因座的屬內種間的歸群方式較為不明確,故挑選剩下可用 於區分屬間關係的基因座作為後續分析,其中有15個基因座支持石 櫟屬與櫟屬形成穩定的單系群,6個基因座支持櫟屬與栗屬形成穩定 的單系群,4個基因座支持栗屬與石櫟屬形成穩定的單系群。由於能 夠明確且最多基因座支持的呈現方式為石櫟屬與櫟屬,故選用此 15 個基因座做為後續親緣關係重建之候選基因。將15個基因座4個屬 (共 7 個種)經 BEAST 重建的親緣關係顯示如圖一。起源時間為約距 今 9900 萬年前,爾後栗屬與石櫟屬及櫟屬兩屬分歧的時間為距今 5300 萬年前,而石櫟屬與櫟屬的分歧時間為 2900 萬年前。親緣關係 樹中,栗屬、櫟屬、石櫟屬這三個屬內種間的歸群支持度(posterior probability)均為1.00,顯示屬內有較高的歸群;而石櫟屬與櫟屬兩個

屬間的歸群支持度為 1.00; 栗屬與石櫟屬及櫟屬兩屬的支持度為 1.00。

台灣產石櫟屬 14 種間親緣關係之重建

台灣產石櫟屬物種間親緣關係重建使用 6 個與蠟生合成基因無 相關的核分子標記,所獲得的基因座長度分別為: CAP (587 bp,含 intron 102 bp)、DGD (536-553 bp, 含 intron 387-404 bp)、ESRK (458-460 bp, 含 intron 198 bp)、FAD (461 bp)、SAHH (461 bp)、SAM (564-565 bp);每個分子標記均以 NJ、ML 及 BI 三種親緣關係重建法分別 確認方法間的歸群結果一致,並確認各別物種的基因所重建的親緣關 係,能夠反映出的物種歸群模式。14種台灣產石櫟屬的親緣關係重建 以 BEAST,其中加入山毛櫸屬、櫟屬、與栗屬的序列加入作為外群, 再以科內屬間重建的親緣關係做為歸群及設定單系群的參考,以殼斗 科的起源時間約距今一億年前、櫟屬與栗屬的分歧時間約距今 5300 萬年前,以及石櫟屬與櫟屬的分歧時間約距今 2900 萬年等三個分子 鐘估算的參考點(calibration points),推論台灣產石櫟屬內的親緣關係 (圖二)。親緣關係的結果顯示石櫟屬的起源約於距今 2400-2800 萬年 前;歸群的結果顯示,科內屬間的支持度(posterior probability)均為 1.00,台灣產石櫟屬葉表無蠟質特徵的物種在親緣關係樹形成兩個分 支,其中一支為油葉石櫟(L. konishii)、後大埔石櫟(L. cornea)一群(分

群支持度>0.999)另一支為三斗石櫟(L. hanceii)、短尾葉石櫟(L. brevicaudatus)、大葉石櫟(L. kawakamii)、大武石櫟(L. harlandii)兩群 單系群(分群支持度為 0.45);而葉表具蠟質表面的物種一樣形成了台 東石櫟(L. taitoensis)、南投石櫟(L. nantoensis)、鬼櫟(L. lepidocarpus)、 浸水營石櫟(L. shinsuiensis)、杏葉石櫟(L. amygdalifolius)一個單系群 (支持度>0.56)及親緣關係較葉表其中一支無蠟的類群(三斗石櫟、短 尾葉石櫟、大葉石櫟、大武石櫟)較近的子彈石櫟、柳葉石櫟、台灣石 櫟兩群。

參考基因與目標基因(蠟相關生合成基因)核苷酸置換率比較

參考基因序列結合了 CAP、DGD、ESRK、FAD、SAHH、SAM 六 個基因座合併共計序列長度 3072 bp,其中含 intron 長度 687 bp。CER1 的部分取得台灣產物種除南投石櫟共 13 種,18 條完整 cDNA 單套型 (haplotype),共計 1701 bp,均為 coding sequence (CDS),共 567 個密 碼子; CER3 取得台灣產物種共 14 種,18 條完整 cDNA 單套型,共 計 1818 bp,均為 CDS,共 606 個密碼子; CER5 取得台灣產物種共 14 種,22 條完整 cDNA 單套型,共計 2058 bp,均為 CDS,共 686 個 密碼子; CER7 取得台灣產物種共 14 種,14 條完整 cDNA 單套型, 共計 1032 bp,均為 CDS,共 344 個密碼子。 (I)比較參考基因 K 值與目標基因 K 值(表四):參考基因的核苷酸 置換率與目標基因的核苷酸置換率在 T 檢定的結果顯示: K 值(平均 0.011)與 CERI 的 K 值(平均 0.01)並無顯著差異(p=0.81),顯示兩基因 的置換率相似;而參考基因與目標基因 CER3、CER5 的 K 值(平均分 別為 0.006 及 0.009)相比則顯著較快(p<0.001; p=0.003);而與目標基 因 CER7 的 K 值(平均 0.013)相比則顯著較慢(p<0.001)。從參考基因 的 K 與目標基因的 K 作圖(圖三)可以發現,CER1、CER5 的斜率>1, 表示參考基因相較於 CER1、CER5 有較快的核苷酸置換率,而 CER3、 CER7 的斜率介於 0 與 1 之間,顯示參考基因相對於 CER3、CER7 有 較慢的演化速率。

(II)比較參考基因 K 值與目標基因 Ks 值:若在相同的演化情境下,Ks 能反映中性演化下核苷酸的置換率,故將參考基因的 K 值分別與目標基因 CERI 的 153 個 Ks 值、CER3 的 153 個 Ks 值、CER5 的 231 個 Ks 值、CER7 的 91 個 Ks 值進行 T 檢定。參考基因 K 值(平均 0.011)顯著較 CER1 的 Ks 值(平均 0.020)慢(p<0.001);顯著較 CER3 的 Ks 值(平均 0.015)慢(p<0.001);顯著較 CER5 的 Ks 值(平均 0.013) 慢(p=0.002);顯著較 CER7 的 Ks 值(平均 0.041)慢(p<0.001)。在此比較中,參考基因 K 值均顯著較所有目標基因 Ks 值慢。由參考基因的 K 與目標基因的 Ks 作圖可以發現,所有的斜率都大於 1,顯示目標</p>

基因的核苷酸置換率在排除非同義置換下,相較於參考基因則擁有較 高的核苷酸置換率。

(III)比較目標基因的 Ka 與 Ks:若在中性演化下,核苷酸的同義 置換率(Ks)與非同義置換率(Ka)會是相同的。經 T 檢定比較目標基因 的 Ka、Ks 值得結果得知: CER1 的 Ka 值(平均 0.008)顯著較 Ks 值低 (p<0.001); CER3 的 Ka 值(平均 0.004)顯著較 Ks 值低(p<.0001); CER5 的 Ka 值(平均 0.009)顯著較 Ks 值低(p<0.0001); CER7 的 Ka 值(平均 0.005)顯著較 Ks 值低(p<0.001)。於此比較中,目標基因的核苷酸非同 義置換率均顯著小於同義置換率。在目標基因本身的 Ka 與 Ks 的作 圖可以得知,所有目標基因的 Ks 均大於 Ka;值得注意的是 CER5 擁 有較大的斜率(=0.456),有相對其他目標基因而言有較高的 Ka 值。

天擇檢測結果

(I)透過 PAML 中的 site model 檢測得知對立假設下的演化模型 (允許 ω>1 的位點出現情境, M2a 模型、M8 模型)其 likelihood 值是 否顯著優於虛無假設(不允許 ω>1 的位點出現情境, M1a 模型、M7 模 型、M8a 模型),分別驗證4個殼斗科石櫟屬蠟相關生合成基因 CER1、 CER3、CER5、CER7 的胺基酸位點(圖四、表五)。結果分別顯示:(1) CER1 的 M2a 顯著的優於 M1a (2ΔL=39.17, p<0.001, ω=6.80); M8 分 別拒絕 M7 (2ΔL=45.97, p<0.001)及 M8a (2ΔL=39.17, p<0.001);M2a 經 Bayes Emprical Bayes (BEB)分析後獲得胺基酸位點 ω>1 的機率 >0.95 者共 8 個, M8 經 BEB 分析後, 得到位點 ω>1 的機率大於 0.95 的胺基酸位點共有 11 個,兩模型及其分別對應的胺基酸位點分別共 同檢測出 ω>1 (M2a: ω=6.80; M8: ω=6.80)的機率且 BEB 大於 0.95 的 胺基酸位點為 94L、122L、124I、208F、266V、309F、369W、372E 共8 個胺基酸位點。(2) CER3 的 M2a 拒絕 M1a(2ΔL=22.39, p<0.001); M8 分別拒絕 M7 (2ΔL=22.75, p<0.001)及 M8a (2ΔL=22.31, p<0.001); 經 M2a 經 BEB 檢測得到 $\omega > 1$ 日機率大於 0.95 的胺基酸位點共 4 個, 而 M8 共 6 個,兩模型共同檢測出 50L、477S、484Q、570A 共 4 個 胺基酸位點 ω>1 (M2a: ω=20.73, M8: ω=20.08)。(3) CER5 的 M2a 拒 絕 M1a(2ΔL=62.65, p<0.001); M8 分別拒絕 M7(2ΔL=63.08, p<0.001) 及 M8a (2ΔL=62.64, p<0.001); M2a 經 BEB 分析得到 ω>1 且機率大 於 0.95 的胺基酸位點共 12 個,而 M8 經 BEB 則得到 15 個位點,兩 模型共同檢測出 ω>1 (M2a: ω=9.78, M8: ω=9.61)的位點為 16G、20E、 147I、328I、336W、348Q、367T、399A、504S、554E、648Q、658R 共 12 個胺基酸位點,是 site model 檢測中檢測到最多位點受到正向 天擇(ω>1)的蠟相關生合成基因。(4) CER7 的 M2a 無法拒絕 M1a (2ΔL=5.95, p=0.05); M8 無法拒絕 M7 (2ΔL=5.97, p=0.05), 但拒絕 M8a (2ΔL=5.94, *p*=0.01);此結果與 T 檢定及迴歸分析結果一致,皆指出 *CER7* 的演化速率慢且不受正向天擇的壓力。值得注意的是,所有受 到正向天擇的胺基酸位點出現的物種均與葉表上有蠟/無蠟的物種歸 群模式不一致,顯示正向天擇雖作用在蠟相關生合成基因的 3 個不同 功能的基因之特定胺基酸位點上,但非特定演化分支受到正向天擇, 而是在這些基因中仍保有容忍胺基酸置換的彈性。

(II)透過 PAML 中的 branch model 檢測對立假設的演化情境(允許 演化 branch 有兩種或兩種以上不同的速率並分別設為 background 與 foreground, 並允許 foreground 的 $\omega>1$)是否拒絕虛無假設的演化情境 (演化 branch 僅有一種速率),分別檢測以下三種演化情境(1) foreground 為有蠟塊物種分別受到獨立演化壓力情境、(2) foreground 為無蠟塊物種的情境、(3) foreground 為有蠟塊物種其祖先受到共同的 演化壓力的演化壓力情境以及後來又出現一次無蠟塊特徵的轉變(圖 五),分別檢測 CER1、CER3、CER5、CER7 四個蠟相關生合成基因是 否符合特定的演化情境。结果分別顯示:情境(1)在 CER1 的對立假設 模型(foreground ω =999.0, Ks=0)拒絕虛無假設模型(2 Δ L=6.75, p<0.01), CER3 (2 Δ L=0.34, p=0.56), CER5 (2 Δ L=0.67, p=0.41), CER7 (2 Δ L=0.67, p=0.21)的對立假設模型皆無法拒絕虛無假設模型;情境(2)在所有基 因含 CER1 (2△L=0.01, p=0.92)、CER3 (2△L=0.15, p=0.70)、CER5
$(2\Delta L=0.01, p=0.92)$ 、*CER7* $(2\Delta L=2.73, p=0.10)$ 的對立假設模型皆無法 拒絕虛無假設模型;情境(3)所有基因含 *CER1* $(2\Delta L=2.69, p=0.26)$ 、 *CER3* $(2\Delta L=0.00, p=NA)$ 、*CER5* $(2\Delta L=0.00, p=1.00)$ 、*CER7* $(2\Delta L=2.73, p=0.26)$ 的對立假設模型皆無法拒絕虛無假設模型(表九);綜合 PAML 的 branch model 的檢測結果,僅 *CER1* 於情境(1)以有蠟塊的物種為 foreground 的情況下偵測到正向天擇($\omega=999, Ks=0$)的訊號。

(III) PAML 中的 branch-site model 檢測對立假設的演化情境(允許 兩個或兩個以上的 foreground, 並允許 foreground 的 $\omega > 1$; 並考慮胺 基酸位點有多種不同的 classes, 並允許 foreground 的 site 的 $\omega > 1$)是 否拒絕虛無假設的演化情境(固定 site 的 $\omega=1$),同樣依據物種葉片有 無蠟塊的特徵分成與 branch model 相同的三個演化情境進行檢測。檢 測結果分別顯示:情境(1)的所有基因含 CER1 (2ΔL=2.75, p=0.10)、 CER3 (2 Δ L=0.00, p=1.00) CER5 (2 Δ L=0.00, p=1.00) CER7 (2 Δ L=0.13, p=0.72)的對立假設模型皆無法拒絕虛無假設模型;情境(2)的所有基 因含 CER1 (2△L=0.00, p=1.00)、CER3 (2△L=0.00, p=0.99)、CER5 (2ΔL=0.74, p=0.39)、CER7 (2ΔL=0.00, p=1.00) 的對立假設模型皆無 法拒絕虛無假設模型(表九);在 branch-site 的檢測中,無任何對立假 設演化模型的 likelihood 顯著的較虛無假設演化模型佳,並無檢測到 與有蠟、無蠟相關的類群上的胺基酸位點有正向天擇(w>1)的訊號,

說明不論有蠟或無蠟的特徵作為 foreground 下, foreground 中的特定 位點皆未檢測出受到正向天擇的位點。

Hyphy 的檢測考慮重組的情況下,亦針對特定的位點進行檢測, 分為 site-model based 的 FUBAR 與 REL,檢測 $\omega > 1$ 的胺基酸位點發 生的位置;以及 branch-site model based 的 MEME 在考慮各自的演化 分支擁有不同的 ω 及檢測檢測 $\omega > 1$ 的胺基酸位點發生的位置。總結 檢測結果(彙整於表五)發現, (1) CER1 以 FUBAR (posterior probability>0.9)檢測到在 112L、208F、266V、309F、372E 共 5 個胺 基酸位點與 PAML 的 site model 同為 $\omega > 1$ 的位點; REL (Bayes factor>50)檢測到在 208F、266V、309F、372E 共 4 個胺基酸位點與 site model 同為 $\omega > 1$ 的位點; MEME 則無檢測到 $\omega > 1$ 的位點。(2) CER3 僅在 FUBAR 檢測到 ω>1 的胺基酸為點僅發生在 570A,且同時成為 唯一與 PAML 的 site model 共同被檢測到 $\omega > 1$ 的位點; branch-site based 的 MEME 並無檢測到 $\omega > 1$ 的訊號及演化分支。(3) CER5 以 FUBAR (>50)檢測到在 16G、20E、147I、328I、336W、348Q、367T、 399A、504S、554E、648Q、658R 共 12 個胺基酸位點與 PAML 的 site model 同為 $\omega > 1$ 的位點; REL (Bayes factor>0.9)檢測到在 16G、20E、 328I、336W、367T、399A、504S、554E、658R 共 9 個胺基酸位點與 site model 同為 ω>1 的位點;雖然 19G 在 PAML site model 中的 M2a 僅獲得 BEB=0.95 (marginally significant)的結果,但在 MEME (p<0.1) 則在 19G 卻檢測到的 ω>1 並在南投石櫟與台灣石櫟的兩個演化分支 檢測到 ω>1 (非同義置換數:1,同義置換數:0)的訊號,以及在 328I 檢測到 ω>1 並在杏葉石櫟的演化分支(非同義置換數:1,同義置換 數:0)與杏葉石櫟、浸水營石櫟、南投石櫟的共祖分支檢測到 ω>1 (非 同義置換數:2,同義置換數:0)的訊號;值得一提的是,在 CER5 中 透過 MEME 檢測到 ω>1 的分支之後皆為有蠟塊的物種。

生理生態的結果與親緣訊息的結果

本實驗針對蠟塊有/無的基本生理生態數值進行量測,測得到酚酸、光合作用產率(Y(II),反映光合作用光系統 II 的產率)、δ¹³C (反映WUE 以及光合作用中的固碳作用)、δ¹⁵N (反映光合作用中,固碳作用使用 RuBP 酵素的多寡)。酚酸的數值介於 29.82-127.85 mg/mL 之間;光合作用產率所量測到的數值介於 0.629-0.771 之間;δ¹³C 數值介於-33.455~-30.451‰之間;δ¹⁵N 的數值介於-2.622~1.125‰之間(表六)。

透過邏輯迴歸檢測先前提出的假說關於:假說(2)防禦權衡假說、 以及假說(3)蠟結晶影響光合作用效率假說。透過邏輯迴歸檢測蠟結 晶有無與酚酸多寡(R²=0.07, *p*=0.24)並無相關性,說明假說(2)並不成 立,植物葉片的物理性防禦與化學性防禦兩者之間並無權衡關係;分 別檢測 Y(II) (R²=0.05, *p*=0.35)、δ¹³C (R²=0.46, *p*=0.35)、δ¹⁵N (R²=0.15, *p*=0.10)皆呈現不顯著,說明假說(3)不成立,植物蠟結晶有無並不影響 葉片的與影響光反應速率快慢與固碳作用的效率。

針對上述的生態性狀數值進行親緣訊息的檢測,分別利用 Moran's I, Abouheif's Cmean, Blomberg's K 進行模擬與分析是否生理生 態呈現的特徵是否受演化關係所影響(結果於表七);而本研究比較目 標基因的演化關係與參考基因的演化關係中是否存在親緣訊息。在由 6 個核基因所重建出的物種樹中, Moran's I 及 Abouheif's Cmean 均無 顯著偏離零(無親緣訊息)。蠟結晶重建的基因樹中,共檢測 CER1、 CER3、CER5、CER7 共 4 個基因樹(圖六)。在 PAML branch model 檢 測到 ω>1 的 CER1 中,檢測到 Moran's I 與 Abouheif's Cmean 顯著偏離 零且為正值的數值在 Y(II)的 Moran's I (I=0.255, p=0.047) 及 Abouheif's C_{mean} (C_{mean} =0.327, p=0.042), δ^{15} N 的 Moran's I (I=0.220, p=0.016)、 Abouheif's *C_{mean}*(*C_{mean}*=0.368, *p*=0.007), 其餘的數值則無; *CER3* 中檢 測到在酚酸的 Moran's I (I=0.335, p=0.016)、 Abouheif's C_{mean} $(C_{mean}=0.388, p=0.021)$ 及 Blomberg's K (K=0.465, p=0.013)及 δ^{15} N 的 Moran's I (I=0.235, p=0.009) 及 Abouheif's C_{mean} (C_{mean}=0.348, p=0.006) 有親緣訊息,其餘的數值則無; CER7 中, Y(II)的 Abouheif's Cmean

 $(C_{mean}=0.365, p=0.022)$ 、Blomberg's K (K=1.122, p=0.005)及 δ^{13} C在的 Moran's I (I=0.256, p=0.023)檢測到親緣訊息,其餘的則無(表八)。說 明在 CER1 基因樹可以預測生態性狀 Y(II)、 δ^{15} N, CER3 基因樹可以 預測生態性狀酚酸、 δ^{15} N, CER7 可以預測生態性狀 Y(II)、 δ^{13} C。



殼斗科石櫟屬親緣關係之探討-櫟屬為石櫟屬之姊妹屬

本研究以多基因座重建石櫟屬、櫟屬、與栗屬間的親緣關係,結 果支持 Manos et al. (2001)所推論的假設,即石櫟屬與櫟屬擁有相較 於栗屬與山毛櫸屬較近的親緣關係,與近年做出推論栗屬與櫟屬為單 系群的親緣關係不一致(Manos et al., 2008; Oh & Manos, 2008)。本研 究認為此相異的結果可能是由於所使用之分子標記的不同產生的差 異; Oh and Manos (2008)所使用之 CRC 基因為花部發育相關基因, 是被子植物中調控心皮發育的重要調控基因(Fourquin et al., 2005; Lee et al., 2005),以此基因做為殼斗的特徵演化為適合的分子標記,有助 於釐清殼斗特徵演化,但若用以推論殼斗科物種間的親緣關係則可能 會因為特徵的適應演化演化與種化的方向不同而得到櫟屬與栗屬為 姊妹屬的推論,而無法忠實地反映出殼斗科物種的演化關係。

葉表蠟適應性的遺傳證據

(I)比較核苷酸置換率之結果

本研究將蠟生合成途徑依照其功能分成三個類群,分別為:脂肪酸鏈之骨架生合成基因、調節生合成相關基因(CER7)與運輸蠟塊基因

(CER5)。透過已知的研究得知, 蠟生合成途徑中的 alkane-forming pathway 中,最開始的 VLC-alkane 的生成過程是: CER3 (VLC-acyl-CoA-reductase)會先將 VLC-acyl-CoA 還原形成 VLC-aldehyde, 之後 則由 CER1 (VLC-aldehyde decarbonylase)將 VLC-acyldehyde 中的羰基 去除,形成 VLC-alkane (C₂₈-C₃₀ 的長烷鏈),成為 alkane-forming pathway 的前驅物(Fu et al., 2015), VLC-alkane 經過修飾加上官能基 之後,經通道蛋白(eg. CER5)運輸到胞外;更早之前的研究更透過透 過酵母菌雙雜合系統的實驗,證實植物中的 CER1、CER3 有蛋白質 間的協同的作用,VLC-acyl-CoA 在 CER3 催化後的中經產物 VLCacyl 馬上經 CER1 催化為 VLC-alkane (Bernard et al., 2012); CER3 除 了與 CER1 有協同作用外, CER3 也受 CER7 的調控, CER7 會透過調 控影響 CER3 的 repressor RNA,進而影響 VLC-alkane 的生合成(Lam et al., 2012; Bernard & Joubes, 2013; Lee & Suh, 2013) •

透過比較 K、Ka、Ks 發現: 同為 alkane-forming pathway 中的骨 架型基因 CER1 與 CER3,兩者在與參考基因 K 值相比時發現,CER1 (mean=0.011)與參考基因的 K 值(mean=0.011, p=0.813)較 CER3 (mean=0.007)與參考基因的 K 值快(mean=0.011, p=5.18E-19)(表四), 在骨架生合成基因中會有這樣的結果,可能是因為 CER3 參與較多蛋 白質或基因之間的交互作用,例如與同為骨架生合成基因的 CER1, 以及調節型基因 CER7 交互作用;在蛋白質互動網絡的研究中,與越多種蛋白質互動的基因,其演化速率(K)會越慢(Fraser et al., 2002)。

進一步探討 CER1 與 CER3 本身的 Ka、Ks 發現骨架生合成基因 在演化上都相當保守(Ka<Ks, ω<1, p<0.001, respectively),可能受到選 汰限制(selective constraint)的結果,由於非同義核苷酸置換,會導致蛋 白質性質改變,所以反映蛋白質演化速率的非同義置換率(Ka),由於 選汰限制的原因,使得 Ka 較慢。

CER5/WBCG12是 ATP binding cassette (ABC)基因家族中的基因 之一,最早於 Pighin et al. (2004)進行表現實驗得知 CER5 參與蠟的運 輸的重要功能。由於蠟生合成的過程會將脂肪酸鏈或長碳鏈進行一定 程度的官能基修飾(Samuels et al., 2008; Bernard & Joubes, 2013),故最 終運輸到表皮的蠟塊(epicuticular wax)在化學結構上是相當多變的 (Samuels et al., 2008; Bernard & Joubes, 2013)。運輸蠟的相關蛋白除了 最早發現的 CER5 外尚有其他三種型式的蠟運輸蛋白存在,如 WBCG11及 WBCG13 (McFarlane et al., 2010; Li et al., 2016),可以推 論在蠟生合成之後的長碳鏈或脂肪酸鏈其結構變異較大,具有較多樣 的型式的通道蛋白即可辨認出較多種類與辨識不同官能基的蠟,使得 蠟質得以運輸到胞外形成表皮蠟質。根據本研究結果,CER5的K (mean=0.001)相較於參考基因的K (mean=0.011)顯著來的慢(p=0.003), 顯示其相較於參考基因保守。

CER7 與 CER3 之間的交互作用與其機制在這幾年內有許多報導 (Hooker *et al.*, 2007; Lam *et al.*, 2012; Lam *et al.*, 2015) ∘ CER7 為 3'→5' exoribonuclease,已知參與阿拉伯芥中蠟生合成基因的調控,藉由辨 識並抑制 trans-acting small interfering RNA (tasiRNA, CER3 的 repressor), 讓參與 alkane-forming pathway 的 CER3 得以作用(Hooker et al., 2007);研究中同時也指出,除了 CER3 的被正向調節外,尚有 ERD14、AUX1、SUI1 及2 個未知功能共5 個基因一樣受到 tasiRNAs 與 CER7 的調控(Lam et al., 2015), 顯示 CER7 具有基因多效性 (pleiotropy)的特質,在基因功能限制的情況下,演化上較為保守 (Hoffmann, 2014)。本研究推論(1) CER3 或 CER7 兩者之一若發生胺 基酸的改變,則會造成基因在表現上的變化(Lam et al., 2012; Lam et al., 2015), 以及(2) CER7 本身具基因多效性調控許多 tasiRNAs, 進而 影響包含 CER3 在內的 5 個基因。這幾個因素導致 CER7 功能保守且 推論受到選汰限制。

(II) PAML 與 HyPhy 檢測之結果

在 PAML 的 site model (M2a, M8)與 HyPhy 的 site-based model (REL, FUBAR)檢測中,均都有檢測到正向天擇位點的基因為: CER1

檢測到4個位點、CER5檢測到9個位點。然而這些位點上受到正向 天擇偏好的胺基酸對應到石櫟屬親緣關係上有蠟結晶與無蠟結晶的 物種上發現受天則偏好的位點的物種與有/無蠟結晶的物種兩者間並 無關連,受天擇偏好所保留的位點,可能反映出的是近期所受到的天 擇壓力,而非之前種化或特徵轉變過程中持續的天擇壓力。

進一步檢視 CER1 的 4 個、CER5 的 9 個可能的正向天擇訊號的 位點,雖然這些位點都不是位在重要的蛋白質結構域(protein domain) 中,但胺基酸的改變可能會造成蛋白質性質上或是次級結構上的改變。 例如:在 CER1 胺基酸序列上的第 208、266 個胺基酸位點為平行的 β-sheet, 第 309 個胺基酸位點是 random coil, 第 372 個胺基酸位點是 α-helix; CER5 胺基酸序列上的第 16、554 個胺基酸位點是 random coil, 第 20、399、504 個胺基酸位點是平行的 β-sheet, 第 328、336、 367、658 個胺基酸位點是 α-helix; α-helix 與 β-sheet 是胺基酸次級結 構的主要構型(Branden, 1999),其中 α-helix 所謂在胺基酸的結構位置 與整體長度是影響到胺基酸性質一個重要的關鍵之一(Engel & DeGrado, 2004); 許多 β-sheet 是由斥水性的胺基酸所構成(Chou & Fasman, 1974; Williams *et al.*, 1987; Jiang *et al.*, 1998), 因此一旦由胺 基酸的性質由斥水性的胺基酸轉成親水性的胺基酸,恐造成次級結構 的改變,進而影響蛋白質性質的改變。

在 branch model 的 3 種情境檢測中,首先檢測蠟結晶基因是否在 特徵轉換的演化分支上具有不同的演化速率,結果顯示僅 CER1 在情 境(1)從無蠟結晶到有蠟結晶的特徵轉換的分支上檢測到 ω>1 (ω=999.0, Ks=0)的訊號;接著進一步檢測造成演化速率不同的原因是 否因為該演化分支受到正向天擇,其結果與中性演化的演化情境 (foreground ω=1)相比為 marginally significant (2ΔL=3.78, p=0.052), 推論 CER1 在有蠟結晶到無蠟結晶轉換地演化的分支中,受到正向天 擇。

葉表蠟結晶對於石櫟屬物種適應與生理生態的影響

為驗證及釐清蠟的有/無可能的生理生態機制,本研究透過生理 生態的測量冀以釐清可能有蠟/無蠟對於生態適應的機制,包含檢測 提出的假說(2):物理/化學防禦權衡假說、及假說(3):蠟結晶影響光 合作用效率假說,進行蠟結晶有/無與生態性狀的邏輯迴歸分析;並對 於其他可能影響植物生理的指標進行量測與分析。另外檢測利用 BEAST 重建的物種樹與基因樹中,是否於生理生態特徵的演化上存 在親緣訊息。

(I)葉表蠟結晶有/無與其他生理生態特徵的相關性分析

本研究以蠟塊有/無做為物理性防禦特徵對照酚酸多寡做為化學

性防禦特徵,探討防禦假說中是否有發現權衡或是共同防禦的現象, 研究指出台灣產 14 種石櫟屬物種,在蠟結晶有/無與酚酸多寡並無相 關(R²=0.07, p=0.25),顯示對於抗微生物與植食者的防禦策略上並無 物理/化學策略上的權衡,亦無共同提升的趨勢;可能的原因是植物所 使用於物理性因子與化學防禦的生化合物種類會隨著物種的不同而 有所差異(Schaller, 2008)。由邏輯迴歸的結果推論,石櫟屬植物在防 禦機制上並無物理性防禦及化學性防禦上的權衡,假說(2)不成立。

針對蠟塊的有/無對於光合作用效率的影響探討,本研究使用了 反映光合作用中光系統 II 的光化學產能 Y (II)及反映暗反應中固碳作 用效率及水使用率的穩定碳同位素 δ¹³C 做為指標。光損害程度影響 到蠟覆蓋葉表的程度,以及蠟也會影響光合作用效率,因此兩者彼此 間的關係是十分重要的(Giese, 1975; Holmes & Keiller, 2002)。透過邏 輯迴歸分析獲得的結果指出,有蠟/無蠟的特徵與 Y (II)的多寡無相關 (R²=0.05, *p*=0.35),亦與 δ¹³C 的多寡無關(R²=0.46, *p*=0.35),顯示蠟結 晶的有/無,並無法反映在代表光合作用的指數上。

(II)親緣訊息的結果

本研究欲透過物種樹或基因樹預測生態性狀之間的相似性,建立物種演化或基因演化與特徵演化的關聯性。藉由親緣訊息的分析結果,

物種樹無法預測生態性狀之間的相似性(無親緣訊息);然而在 CERI 的基因樹演化可以預測 Y(II)與δ¹⁵N 生態性狀的相似性(具親緣訊息), 由 Moran's I 及 Abouheif's C_{mean}為正值且顯著偏離零的結果可以推論, 物種間 CERI 基因親緣關係越近的類群,其生態性狀的相似性越高, 顯示 CERI 基因的演化與光合作用效率有關;由 PAML 的 branch model 情境檢測中, CERI 的基因演化,在獲得蠟結晶特徵的獨立演化事件 的演化分支,相較於其他演化分支有不同的演化速率,雖然僅反映出 特徵演化的分支受到不同的選汰壓力,但過程中可能影響到光合作用 的效率,間接反映在與 Y(II)與δ¹⁵N 的親緣訊息檢測上;由上述推測: CERI 基因樹反映出性狀特徵的演化之間的關聯性,可能是適應性演 化造成的結果。

雖然分別在 CER3 的酚酸與 δ¹⁵N,以及 CER7 的 Y(II)與 δ¹³C 檢 測到親緣訊息,但蠟骨架生合成基因 CER3 與調節型 CER7 基因在 PAML 的 branch model 檢測中均無法檢測出在特徵轉換的過程中有不 同的演化速率。透過親緣訊息的檢測,雖然 CER3 跟酚酸、δ¹⁵N 及 CER7 跟 Y(II)、δ¹³C 可能彼此有關,但這些基因樹與特徵之間的關聯 性與適應性的演化關係仍未知。

蠟結晶特徵轉換與適應性演化發生的原因

PAML 檢測出石櫟屬的 CER1 基因演化,在由無蠟結晶變成有蠟結晶的特徵轉換過程中,檢測到有不同的選汰壓力(foreground ω=999.0, backbround ω=0.4616),造成選汰壓力的改變有可能反映出當下物種適應不同的環境,進而反映在與性狀相關的功能性基因上。 三次獨立的獲得蠟結晶特徵的演化分支,其演化時間分別在 1473 萬年前到 1116 萬年前、1000 萬年前至今、以及 855 萬年前至今三個時間點(圖二)。

實驗室團隊於先前石櫟屬的生物地理研究中(未發表資料),透過 多樣性速率的研究,發現石櫟屬物種一共發生兩次多樣性速率的改變, 期間造成物種多樣性上升,分別是發生在中新世中期(約距今1500萬 年前)以及發生在上新世初期(約距今600萬年前);石櫟屬物種發生中 新世中期的多樣性速率變化時期,此時的海平面尚未將陸橋淹沒(Hall, 2002),正是發生東亞地區石櫟屬物種,經中南半島連接到大巽他群島 (Greater Sunda Islands)的陸橋,進行長距離播遷的時期;此外中新世 中期至上新世初期發生劇烈的氣候變化(Susilohadi *et al.*, 2009),這樣 的結果都可能加劇族群間的分化與種化的發生,並伴隨適應新環境的 物種產生。

CERI 基因在情境檢測中偵測到在獨立獲得蠟結晶的演化分支與 其他演化分支有不一樣的演化速率,同時在親緣訊息的檢測中也發現, 在 CER1 基因樹的演化可以預測物種間代表光反應指數 Y(II),與固 碳作用中 RuBP 酵素多寡的指數 δ^{15} N 的性狀,即 *CER1* 基因的演化 與反映光合作用的效率的指數之間有所關連;這樣的結果暗示,在物 種長距離遷徙及適應環境劇烈變化的過程中,面臨不同的選汰壓力, 而反映在參與蠟骨架生合成基因的 CERI 基因演化上,也發生在特徵 轉換的過程中,同時 CERI 基因與光合作用效率有關聯,這也反映出 植物適應不同環境所呈現不同的生理生態性狀。就演化時間而言, CER1 檢測到有不同演化速率的 3 次演化分支範圍約在距今 1400 萬 年前至800萬年前,遠比台灣島距今200萬年前形成的時間(Ho, 1986; Liu et al., 2000) 還早,推測現今在台灣的石櫟屬物種非單一起源,可 能是早期經由冰河期擴張至台灣的祖先物種;另外 CER1 基因的演化 分支檢測到不同選汰壓力,也反映了當時受到不同環境適應的壓力與 受到正向天擇, CERI 基因的演化與光合作用性狀的關聯性可能反映 的是早先祖先適應性特徵(adaptive traits)。

結論

葉表蠟塊的演化是陸生植物適應環境一個重要的特徵之一,本研 究透過檢測台灣產石櫟屬蠟生合成基因的遺傳與葉片生理生態方面 的證據,認為石櫟屬物種在適應環境的過程中,獲得葉下表面蠟結晶 特徵。本研究首先透過重建殼斗科屬間親緣關係得知石櫟屬的姐妹屬 為櫟屬。接著比較蠟生合成基因之間的核苷酸同義置換率及非同義置 换率的研究,發現蠟相關生合成基因在演化上較保守(Ka<Ks),與大 部分重要的功能性基因一樣,在演化上受到選汰限制;然而進一步透 過 PAML 檢測不同特徵轉換情境下 4 個蠟生合成基因的演化可以發 現,在情境(1)變成有蠟塊特徵的轉換上,在蠟骨架生合成基因 CER1 發現到有 $\omega > 1$ 的訊號,假設這樣的結果是因為特徵轉換的過程中受 到不同的選汰壓力;同時在 PAML 與 HyPhy 的檢測中也發現 CER1 基因在 4 個基酸位點檢測到正向天擇(ω>1),雖然這些檢測到正向天 擇位點無法反映現今物種葉下表面蠟結晶有/無的特徵,但可以推論 正向天擇發生在石櫟屬物種獲得蠟結晶的演化分支上。進一步檢測與 蠟形態相關的生理生態數值,以驗證防禦權衡假說及蠟影響光合作用 效率假說;首先經迴歸分析的結果得知,蠟結晶有/無做為物理性防禦 的特徵與化學性防禦特徵的酚酸無相關性、蠟結晶有/無的特徵也與 代表光合作用的指數無相關性;皆無法證實權衡假說與影響光合作用 效率假說存在。然而在親緣訊息的檢測中,CERI的演化反映出與光 合作用指數 Y(II)、及δ¹⁵N兩個生態特徵的關連性;結合實驗室團隊 在石櫟屬物種生物地理上的結果,推論物種在長距離遷徙的過程與適 應環境劇烈變化中,受到不同的選汰壓力與正向天擇,同時也發生自 無蠟結晶到有蠟結晶的特徵轉換,推論蠟結晶的特徵轉換是經不同的 選汰壓力下,適應的結果。本研究透過遺傳及生理生態的實驗證實蠟 結晶生合成基因受到天擇,而這些基因的適應性演化在光合作用效率 上,及生態適應方面均扮演重要的角色。



參考文獻

- **Abouheif E. 1999.** A method for testing the assumption of phylogenetic independence in comparative data. *Evolutionary Ecology Research* **1**(8): 895-909.
- **Agrawal AA. 2007.** Macroevolution of plant defense strategies. *Trends in Ecology & Evolution* **22**(2): 103-109.
- Anisimova M, Nielsen R, Yang ZH. 2003. Effect of recombination on the accuracy of the likelihood method for detecting positive selection at amino acid sites. *Genetics* 164(3): 1229-1236.
- Barthlott W, Neinhuis C, Cutler D, Ditsch F, Meusel I, Theisen I, Wilhelmi H. 1998. Classification and terminology of plant epicuticular waxes. *Botanical Journal of the Linnean Society* **126**(3): 237-260.
- Bernard A, Domergue F, Pascal S, Jetter R, Renne C, Faure JD, Haslam RP, Napier JA, Lessire R, Joubes J. 2012. Reconstitution of plant alkane biosynthesis in yeast demonstrates that Arabidopsis *ECERIFERUM1* and *ECERIFERUM3* are core components of a very-long-chain alkane synthesis complex. *Plant Cell* 24(7): 3106-3118.
- Bernard A, Joubes J. 2013. Arabidopsis cuticular waxes: Advances in synthesis, export and regulation. *Progress in Lipid Research* 52(1): 110-129.
- **Blomberg SP, Garland T, Ives AR. 2003.** Testing for phylogenetic signal in comparative data: Behavioral traits are more labile. *Evolution* **57**(4): 717-745.
- Blum A. 2009. Effective use of water (EUW) and not water-use efficiency (WUE) is the target of crop yield improvement under drought stress. *Field Crops Research* 112(2-3): 119-123.
- Bourdenx B, Bernard A, Domergue F, Pascal S, Leger A, Roby D, Pervent M, Vile D, Haslam RP, Napier JA, et al. 2011. Overexpression of Arabidopsis *ECERIFERUM1* promotes wax very-long-chain alkane biosynthesis and influences plant response to biotic and abiotic stresses. *Plant Physiology* 156(1): 29-45.
- Branden Cl. 1999. Introduction to protein structure: Garland Science.
- **Campbell SA, Kessler A. 2013.** Plant mating system transitions drive the macroevolution of defense strategies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**(10): 3973-3978.
- Cheeke PR. 1989. Toxicants of plant origin: Alkaloids. Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Chou PY, Fasman GD. 1974. Conformational Parameters for Amino-Acids in Helical, Beta-Sheet, and Random Coil Regions Calculated from Proteins. *Biochemistry* 13(2): 211-222.

- Delport W, Poon AFY, Frost SDW, Pond SLK. 2010. Datamonkey 2010: a suite of phylogenetic analysis tools for evolutionary biology. *Bioinformatics* 26(19): 2455-2457.
- **Deng M, Li QS, Yang ST, Liu YC, Xu J. 2013.** Comparative morphology of leaf epidermis in the genus *Lithocarpus* and its implication in leaf epidermal feature evolution in Fagaceae. *Plant Systematics and Evolution* **299**(3): 659-681.
- **Dodd RS, Afzal-Rafii Z. 2000.** Habitat-related adaptive properties of plant cuticular lipids. *Evolution* **54**(4): 1438-1444.
- **Doyle JJ, Doyle JL. 1987.** A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* **19**: 11-15.
- **Dray S, Dufour AB. 2007.** The ade4 package: Implementing the duality diagram for ecologists. *Journal of Statistical Software* **22**(4): 1-20.
- Drummond AJ, Suchard MA, Xie D, Rambaut A. 2012. Bayesian Phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution* 29(8): 1969-1973.
- Engel DE, DeGrado WF. 2004. Amino acid propensities are position-dependent throughout the length of alpha-helices. *Journal of Molecular Biology* 337(5): 1195-1205.
- Engelberth J. 2006. Plant Physiology. Sunderland, UK: Sinauer Associates.
- Farquhar GD, Ehleringer JR, Hubick KT. 1989. Carbon isotope discrimination and photosynthesis. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 40: 503-537.
- **Fordyce JA, Agrawal AA. 2001.** The role of plant trichomes and caterpillar group size on growth and defence of the pipevine swallowtail *Battus philenor*. *Journal of Animal Ecology* **70**(6): 997-1005.
- **Fourquin C, Vinauger-Douard M, Fogliani B, Dumas C, Scutt CP. 2005.** Evidence that *CRABS CLAW* and *TOUSLED* have conserved their roles in carpel development since the ancestor of the extant angiosperms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**(12): 4649-4654.
- **Fraenkel GS. 1959.** The Raison d'Être of Secondary Plant Substances: These odd chemicals arose as a means of protecting plants from insects and now guide insects to food. *Science* **129**(3361): 1466-1470.
- Fraser HB, Hirsh AE, Steinmetz LM, Scharfe C, Feldman MW. 2002. Evolutionary rate in the protein interaction network. *Science* 296(5568): 750-752.
- Fu WJ, Chi Z, Ma ZC, Zhou HX, Liu GL, Lee CF, Chi ZM. 2015. Hydrocarbons, the advanced biofuels produced by different organisms, the evidence that alkanes in petroleum can be renewable. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99(18): 7481-7494.
- Furstenberg-Hagg J, Zagrobelny M, Bak S. 2013. Plant defense against insect

herbivores. International Journal of Molecular Sciences 14(5): 10242-10297.

- **Gambino G, Perrone I, Gribaudo I. 2008.** A rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants. *Phytochemical Analysis* **19**(6): 520-525.
- **Giese BN. 1975.** Effects of light and temperature on the composition of epicuticular wax of barley leaves. *Phytochemistry* **14**(4): 921-929.
- Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O. 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology* **59**(3): 307-321.
- Hackathon R, Bolker B, Butler M, Cowan P, Vienne D, Eddelbuettel D 2011. Phylobase: Base package for phylogenetic structures and comparative data, R package version 0.6. 3.
- Hall R. 2002. Cenozoic geological and plate tectonic evolution of SE Asia and the SW Pacific: computer-based reconstructions, model and animations. *Journal of Asian Earth Sciences* 20(4): 353-431.
- Hall TA 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic acids symposium series*. 95-98.
- Harmon LJ, Weir JT, Brock CD, Glor RE, Challenger W. 2008. GEIGER: investigating evolutionary radiations. *Bioinformatics* 24(1): 129-131.
- Haworth M, McElwain J. 2008. Hot, dry, wet, cold or toxic? Revisiting the ecological significance of leaf and cuticular micromorphology. *Palaeogeography Palaeoclimatology Palaeoecology* 262(1-2): 79-90.
- Heled J, Drummond AJ. 2010. Bayesian inference of species trees from multilocus data. Molecular Biology and Evolution 27(3): 570-580.
- **Hill RS. 1998.** Fossil evidence for the onset of xeromorphy and scleromorphy in Australian Proteaceae. *Australian Systematic Botany* **11**(3-4): 391-400.
- **Ho CS. 1986.** A Synthesis of the Geologic Evolution of Taiwan. *Tectonophysics* **125**(1-3): 1-16.
- **Hoffmann A. 2014.** Evolutionary limits and constraints. *The Princeton guide to evolution. Princeton University Press, Princeton*: 247-252.
- Holmes MG, Keiller DR. 2002. Effects of pubescence and waxes on the reflectance of leaves in the ultraviolet and photosynthetic wavebands: a comparison of a range of species. *Plant Cell and Environment* 25(1): 85-93.
- Hooker TS, Lam P, Zheng HQ, Kunst L. 2007. A core subunit of the RNAprocessing/degrading exosome specifically influences cuticular wax biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Cell* **19**(3): 904-913.
- Huang C, Zhang Y, Bartholomew B 1999. Fagaceae. In: Wu Zhengyi PHRHD ed. *Flora* of China. Beijing, China: Science Press (Beijing) & Missouri Botanical Garden (St.

Louis), 314-400.

- Jenks MA, Rich PJ, Ashworth EN. 1994. Involvement of cork cells in the secretion of epicuticular wax filaments on *Sorghum bicolor* (L) Moench. *International Journal of Plant Sciences* 155(5): 506-518.
- Jiang B, Guo T, Peng LW, Sun ZR. 1998. Folding type-specific secondary structure propensities of amino acids, derived from alpha-helical, beta-sheet, alpha/beta, and alpha+beta proteins of known structures. *Biopolymers* **45**(1): 35-49.
- Jombart T, Balloux F, Dray S. 2010. adephylo: new tools for investigating the phylogenetic signal in biological traits. *Bioinformatics* 26(15): 1907-1909.
- Kamilar JM, Cooper N. 2013. Phylogenetic signal in primate behaviour, ecology and life history. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* 368(1618).
- Kannangara R, Branigan C, Liu Y, Penfield T, Rao V, Mouille G, Hofte H, Pauly M, Riechmann JL, Broun P. 2007. The transcription factor WIN1/SHN1 regulates cutin biosynthesis in Arabidopsis thaliana. Plant Cell 19(4): 1278-1294.
- Kembel SW, Cowan PD, Helmus MR, Cornwell WK, Morlon H, Ackerly DD, Blomberg SP, Webb CO. 2010. Picante: R tools for integrating phylogenies and ecology. *Bioinformatics* 26(11): 1463-1464.
- Kerstiens G. 2006. Water transport in plant cuticles: an update. *Journal of Experimental Botany* 57(11): 2493-2499.
- Koenig D, Jimenez-Gomez JM, Kimura S, Fulop D, Chitwood DH, Headland LR, Kumar
 R, Covington MF, Devisetty UK, Tat AV, et al. 2013. Comparative transcriptomics reveals patterns of selection in domesticated and wild tomato. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 110(28): E2655-E2662.
- Kosma DK, Bourdenx B, Bernard A, Parsons EP, Lu S, Joubes J, Jenks MA. 2009. The Impact of Water Deficiency on Leaf Cuticle Lipids of Arabidopsis. *Plant Physiology* **151**(4): 1918-1929.
- **Kunst L, Samuels AL. 2003.** Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax. *Progress in Lipid Research* **42**(1): 51-80.
- Lam P, Zhao LF, Eveleigh N, Yu Y, Chen XM, Kunst L. 2015. The exosome and transacting small interfering RNAs regulate cuticular wax biosynthesis during Arabidopsis inflorescence stem development. *Plant Physiology* 167(2): 323-U530.
- Lam P, Zhao LF, McFarlane HE, Aiga M, Lam V, Hooker TS, Kunst L. 2012. RDR1 and SGS3, Components of RNA-Mediated Gene Silencing, Are Required for the Regulation of Cuticular Wax Biosynthesis in Developing Inflorescence Stems of Arabidopsis. *Plant Physiology* 159(4): 1385-1395.

- Lee JY, Baum SF, Oh SH, Jiang CZ, Chen JC, Bowman JL. 2005. Recruitment of CRABS CLAW to promote nectary development within the eudicot clade. Development 132(22): 5021-5032.
- Lee SB, Suh MC. 2013. Recent Advances in Cuticular Wax Biosynthesis and Its Regulation in Arabidopsis. *Molecular Plant* 6(2): 246-249.
- Li NN, Xu CC, Li-Beisson YH, Philippar K. 2016. Fatty acid and lipid transport in plant cells. *Trends in Plant Science* 21(2): 145-158.
- Liao J-C. 1996. Fagaceae in flora of Taiwan. *Editorial Committee of the Flora of Taiwan: Taipei* 2: 51-123.
- Liu TK, Chen YG, Chen WS, Jiang SH. 2000. Rates of cooling and denudation of the Early Penglai Orogeny, Taiwan, as assessed by fission-track constraints. *Tectonophysics* **320**(1): 69-82.
- Müller C. 2006. Biology of the plant cuticle. Blackwell Publishing Ltd: Oxford, UK.
- Manos PS, Cannon CH, Oh S-H. 2008. Phylogenetic relationships and taxonomic status of the paleoendemic Fagaceae of western North America: recognition of a new genus, *Notholithocarpus*. *Madrono* **55**(3): 181-190.
- Manos PS, Stanford AM. 2001. The historical biogeography of Fagaceae: Tracking the tertiary history of temperate and subtropical forests of the Northern Hemisphere. *International Journal of Plant Sciences* 162: S77-S93.
- Manos PS, Steele KP. 1997. Phylogenetic analyses of "higher" Hamamelididae based on plastid sequence data. *American Journal of Botany* 84(10): 1407-1419.
- Manos PS, Zhou ZK, Cannon CH. 2001. Systematics of Fagaceae: Phylogenetic tests of reproductive trait evolution. *International Journal of Plant Sciences* 162(6): 1361-1379.
- Matasci N, Hung LH, Yan ZX, Carpenter EJ, Wickett NJ, Mirarab S, Nguyen N, Warnow T, Ayyampalayam S, Barker M, et al. 2014. Data access for the 1,000 Plants (1KP) project. *Gigascience* **3**.
- McFarlane HE, Shin JJH, Bird DA, Samuels AL. 2010. Arabidopsis ABCG transporters, which are required for export of diverse cuticular lipids, dimerize in different combinations. *Plant Cell* 22(9): 3066-3075.
- Moctezuma C, Hammerbacher A, Heil M, Gershenzon J, Mendez-Alonzo R, Oyama K. 2014. Specific polyphenols and tannins are associated with defense against insect herbivores in the tropical oak *Quercus oleoides*. *Journal of Chemical Ecology* 40(5): 458-467.
- Moles AT, Peco B, Wallis IR, Foley WJ, Poore AGB, Seabloom EW, Vesk PA, Bisigato AJ, Cella-Pizarro L, Clark CJ, et al. 2013. Correlations between physical and chemical defences in plants: tradeoffs, syndromes, or just many different ways to skin a herbivorous cat? *New Phytologist* **198**(1): 252-263.

- **Monneveux P, Belhassen E. 1996.** The diversity of drought adaptation in the wide. *Plant Growth Regulation* **20**(2): 85-92.
- Moran PA. 1950. Notes on continuous stochastic phenomena. *Biometrika* 37(1/2): 17-23.
- **Mulroy TW. 1979.** Spectral properties of heavily glaucous and non-glaucous leaves of a succulent rosette-plant. *Oecologia* **38**(3): 349-357.
- Munkemuller T, Lavergne S, Bzeznik B, Dray S, Jombart T, Schiffers K, Thuiller W. 2012. How to measure and test phylogenetic signal. *Methods in Ecology and Evolution* **3**(4): 743-756.
- Myers JHB, D. 1991. *Phytochemical induction by herbivores*. New York, NY, USA: John Wiley & Sons.
- Nielsen R, Yang ZH. 1998. Likelihood models for detecting positively selected amino acid sites and applications to the HIV-1 envelope gene. *Genetics* 148(3): 929-936.
- Nixon KC, Crepet WL. 1989. *Trigonobalanus* (Fagaceae) Taxonomic Status and Phylogenetic-Relationships. *American Journal of Botany* **76**(6): 828-841.
- **Ogburn RM, Edwards EJ. 2010.** The ecological water-use strategies of succulent plants. *Advances in Botanical Research* **55**: 179-225.
- Oh SH, Manos PS. 2008. Molecular phylogenetics and cupule evolution in Fagaceae as inferred from nuclear *CRABS CLAW* sequences. *Taxon* **57**(2): 434-451.
- Paradis E, Claude J, Strimmer K. 2004. APE: Analyses of Phylogenetics and Evolution in R language. *Bioinformatics* 20(2): 289-290.
- Perez-Harguindeguy N, Diaz S, Garnier E, Lavorel S, Poorter H, Jaureguiberry P, Bret-Harte MS, Cornwell WK, Craine JM, Gurvich DE, et al. 2013. New handbook for standardised measurement of plant functional traits worldwide. *Australian Journal of Botany* 61(3): 167-234.
- Pighin JA, Zheng HQ, Balakshin LJ, Goodman IP, Western TL, Jetter R, Kunst L, Samuels AL. 2004. Plant cuticular lipid export requires an ABC transporter. *Science* 306(5696): 702-704.
- **Pond SLK, Frost SDW. 2005.** Datamonkey: rapid detection of selective pressure on individual sites of codon alignments. *Bioinformatics* **21**(10): 2531-2533.
- **Pond SLK, Frost SDW, Muse SV. 2005.** HyPhy: hypothesis testing using phylogenies. *Bioinformatics* **21**(5): 676-679.
- **Pond SLK, Posada D, Gravenor MB, Woelk CH, Frost SDW. 2006.** GARD: a genetic algorithm for recombination detection. *Bioinformatics* **22**(24): 3096-3098.
- R Core Team. 2013. R: A language and environment for statistical computing.
- **Rambaut A. 2015.** FigTree, ver. 1.4. 2. *Available: http:/tree. bio. ed. ac. uk/software/figtree/Accessed on* **28**.

Rambaut A, Suchard M, Xie D, Drummond A 2014. Tracer v1. 6.

- **Rattan RS. 2010.** Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. *Crop Protection* **29**(9): 913-920.
- **Reina-Pinto JJ, Yephremov A. 2009.** Surface lipids and plant defenses. *Plant Physiology and Biochemistry* **47**(6): 540-549.
- **Revell LJ. 2012.** phytools: an R package for phylogenetic comparative biology (and other things). *Methods in Ecology and Evolution* **3**(2): 217-223.
- Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Hohna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck JP. 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. Systematic Biology 61(3): 539-542.
- **Rosenthal GA, Berenbaum MR. 2012.** *Herbivores: Their interactions with secondary plant metabolites*: Academic Press.
- Samuels L, Kunst L, Jetter R. 2008. Sealing plant surfaces: Cuticular wax formation by epidermal cells. *Annual Review of Plant Biology* 59: 683-707.
- Schaller AH, G.A. 2008. Induced plant resistance to herbivory. Berlin, Germany: Springer Science+Business Media.
- **Shimodaira H, Hasegawa M. 1999.** Multiple comparisons of log-likelihoods with applications to phylogenetic inference. *Molecular Biology and Evolution* **16**(8): 1114-1116.
- Susilohadi S, Gaedicke C, Djajadihardja Y. 2009. Structures and sedimentary deposition in the Sunda Strait, Indonesia. *Tectonophysics* 467(1-4): 55-71.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. Molecular Biology and Evolution 30(12): 2725-2729.
- **Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. 1997.** The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* **25**(24): 4876-4882.
- Waters ER. 2003. Molecular adaptation and the origin of land plants. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **29**(3): 456-463.
- Williams RW, Chang A, Juretic D, Loughran S. 1987. Secondary Structure Predictions and Medium Range Interactions. *Biochimica Et Biophysica Acta* 916(2): 200-204.
- Yang Z. 2007. PAML 4: Phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Molecular Biology* and Evolution 24(8): 1586-1591.
- Yeats TH, Rose JKC. 2013. The formation and function of plant cuticles. *Plant Physiology* **163**(1): 5-20.
- Zhou W, Xia NH. 2012. Leaf epidermal features of Lithocarpus (Fagaceae) from China

and their systematic significance. *Botanical Journal of the Linnean Society* **168**(2): 216-228.





圖一、殼斗科之科內屬間親緣關係之重建。屬間之親緣關係重建使用 15 個基 因座,星號所標記的節點為所使用之定年時間參考點,節點上的數值代表分歧 時間(百萬年),所有分支支持度均等於 1.00;位於節點上的長條為 hight 95% HPD。



圖二、台灣產石櫟屬之親緣關係重建。台灣產石櫟屬利用 6 個核分子標記(CAP、 DGD、ESRK、FAD、SAHH、SAM)與使用 F. sylvatica、C. mollissima、Q. robur 三個 屬作為外群,進行石櫟屬物種間親緣關係重建。分支標記粗線代表 posterior probability>0.5;石櫟屬物種標記深底色者為葉表上具蠟結晶的物種,淺底色為 無結晶物種;物種分歧時間標示在節點上。



圖三、核苷酸置換率之配對比較作圖。(a)-(d)依序表示表示參考基因的 K (x)對目標基因 CER1、 CER3、CER5、CER7 的 K (y)作圖; (e)-(h)依序表示參考基因的 K (x)對目標基因 CER1、CER3、CER5、 CER7 的 Ks (y)作圖; (i)-(I)表示目標基因 CER1、CER3、CER5、CER7 的 Ka (x)對 Ks (y)作圖。p<0.05 表示顯著相關;虛線為斜率等於 1 之對角線;實線為迴歸線; R²表示相關係數。

		CE	R1		CER5								
wax	208 F	266 V	309 F	372 E	16 G	20 E	3281	336 W	367 T	399 A	504 S	554 E	658 R
L. taitoensis	F	V	L	E	G	Е	А	W	Т	V	S	E	Н
L. amygdalifolius	F	v	F	E	G	E/K	I/A	W	т	А	S	E	R
L. nantoensis					v	E	А	w	т	А	S	E	R
L. lepidocarpus	F	V	L	E	G	E	А	W	Т	А	S	E	R
L. shinsuiensis	F	V	L	E	V/G	Е	1	W	Т	A	S	E	R
L. glaber	L	V	L	К	G	E	А	R	т	V	Т	E	н
L. dodonaeifolius	F	V	L	К	G	E	А	W	Т	V	Т	D	Q
L. formosanus	F	V	L	K	G	E	А	W	Т	V	Т	D	Q
L. harlandii	F	V	L	к	G	E	А	W	S	А	Т	D	Q
L. hanceii	L	V	1	E	G	E	А	R	Т	V	S	E	н
L. brevicaudatus	L	V	F	K	G	Е	А	W	Т	V	S	E	Н
L. kawakamii	F	۷	1	E	G	к	А	W	Т	V	S	E	Н
L. cornea	F	T/M	L	E	G	E	А	W	S	А	С	D	Н
L. konishii	F	Т	L	E	G	E	А	W	S	А	С	D	Н
non-wax	non-wax												

圖四、Site-based model 分別以 PAML 與 HyPhy 共同檢測之位點。利用 PAML (M2a 與 M8)與 HyPhy (REL 與 FUBAR)檢測且之胺基酸 位點。表格中粗體代表 ω>1 之胺基酸,若有兩種不同的等位基因則分別標示之並以斜線作區分;台灣產石櫟屬之親緣關係為 BEAST 法重建之樹型,親緣關係樹上粗體的部分代表葉表上有蠟塊的物種;胺基酸中標示深色背景者為ω>1。



圖五、PAML 中之 branch model 與 branch-site model 所設定用以檢測之演化情境 及使用之 cladogram。三種演化情境分別允許特定演化分支的 ω>1 (#1, #2);。(a) 為情境(1),特徵從無蠟轉變成有蠟;(b)為情境(2),特徵從有蠟轉變成無蠟;(c)為 情境(3),特徵先從無蠟轉換成有蠟,再經過第二次特徵轉換成有蠟變無蠟。標記 粗體的 OTUs 為有蠟物種。



圖六、(a), (b), (c), (d)分別為 CER1、CER3、CER5、CER7 的基因樹, 粗線分支代表 NJ 的 bootstrap>50、節點左邊數值代表 ML 的 SH-like support 值(<0.5 以-表示)、 右邊代表 BI 的 posterior probability 值(<0.5 以-表示); 石櫟屬物種名稱的縮寫與 表一相同,後方數字及代號代表不同的異型合子。



圖七、(a), (b), (c), (d)分別為 BEAST 重建之 CER1、CER3、CER5、CER7 之基因樹, 樹型用以進行親緣訊息的分析。物種的縮寫名稱與表一使用的名稱相同。

中文名	學名	分布地區	海拔(m)	蠟結晶	保育等級	樣本代號	樣本編號
杏葉石櫟	L. amygdalifolius	中國大陸、台灣中南部中低海拔山區	250-2000	有	LC	amy	5353
短尾葉石櫟	L. brevicaudatus	中國大陸江南各省、台灣全島中低海拔山區	350-2350	無	LC	bre	08-05
後大埔石櫟	L. cornea	中國大陸、台灣中南部、中部中低海拔山區	700-1300	無	LC	cor	1270-1
柳葉石櫟*	L. dodonaeifolius	台灣南部中低海拔山區	350-1600	有	VU	dod	5150
台灣石櫟*	L. formosanus	台灣恆春低海拔山區	100-550	有	CR	for	912-07
子彈石礫	L. glaber	中國大陸、日本、琉球、台灣北部、台灣中部中低海拔山區	450-1050	有	LC	gla	UA
山斗石櫟	L. hanceii	中國大陸、台灣全島中低海拔山區	1000-2700	無	LC	han	1552
大武石櫟	L. harlandii	台灣東南部及南部低海拔山區、香港、九龍一帶	350-600	無	EN	har	3863
大葉石櫟*	L. kawakamii	台灣全島中海拔、中部低海拔山區	350-2350	無	LC	kaw	3938
油葉石櫟	L. konishii	台灣全島中低海拔山區、海南島	100-1150	無	LC	kon	1482
鬼櫟*	L. lepidocarpus	台灣中南部中低海拔山區、東部低海拔山區	600-2230	有	LC	lep	3200
南投石櫟*	L. nantoensis	台灣中部中低海拔山區	550-1300	有	UV	nan	5248
浸水營石櫟*	L. shinsuiensis	台灣大武至恆春半島低海拔山區	300-1200	有	EN	shi	02-14
菱果石櫟	L. taitoensis	中國大陸江南各省、台灣中部、南部、東部、東北部低海拔山區	700-1300	有	LC	tai	973-2

表一、台灣產石櫟屬物種之地理分布及葉下表面蠟結晶之特徵有無與其保育等級、樣本編號及簡寫資訊

*台灣特有種;保育等級:LC 安全、VU 易危、EN 瀕危、CR 極危;樣本編號:編號為福山植物園區內之編號(UA: unassigned)

表一、	臿建乙繼屬	問組絵關係	庙田ク候選其	因及其功能描述
ハー	主赶加你倒	间加小个的小	及川~医运坐	四次六功肥油处

Name	AT	LH	LS	FS	СС	СР	QS	QR	Gene function
UK	AT1G02020	TR10193_	TR10193_	SVVG-	NHUA-	UZWG-	HENI-	2725	Nitroreductase family protein; FUNCTIONS IN: oxidoreductase activity, acting on NADH or NADPH, nitrogenous
		cgi092	cgi092	2067395	2068396	2012150	2042413		group as acceptor, oxidoreductase activity; INVOLVED IN: metabolic process; LOCATED IN: chloroplast;
									EXPRESSED IN: 23 plant structures; EXPRESSED DURING: 13 growth stages; CONTAINS InterPro DOMAIN/s:
									Nitroreductase-like (InterPro:IPR000415)
SUN1	AT5G04990	TR10220	TR10220	SVVG-	NHUA-	UZWG-	HENI-	2840	Encodes a member of the Sad1/UNC-84 (SUN)-domain proteins: AtSUN1(At5g04990), AtSUN2(AT3G10730). SUN
				2013709	2013980	2000866	2051636		domain proteins are part of the cytoskeletal-nucleoskeletal bridging complexes. AtSUN1 and AtSUN2 are
									localized to the nuclear envelope and are present as homomers and heteromers in vivo. Encodes an outer nuclear
									membrane protein that anchors RanGAP1 to the nuclear envelope. It interacts with WPP domain interacting-
									proteins (WIPs). It is involved in maintaining the elongated nuclear shape of epidermal cells.
WRKY13	AT4G39410	TR10240	TR10240	SVVG-	NHUA-	UZWG-	HENI-	419	Encodes a member of the Group II-c WRKY Transcription Factor family that is involved in stem development and
				2010911	2012097	2090230	2051496	L	has been shown to directly bind to the promoter of NST2. Mutants show a weak stem phenotype and show
								1	decreased expression of lignin-synthesis-related genes
UK	AT2G31620	TR10245	TR10245	SVVG-	NHUA-	UZWG-	HENI-	1353	Receptor-like protein kinase-related family protein; FUNCTIONS IN: molecular_function unknown; INVOLVED IN:
				2066262	2013292	2014772	2036804		biological_process unknown; LOCATED IN: endomembrane system; CONTAINS InterPro DOMAIN/s: Protein of
									unknown function DUF26 (InterPro:IPR002902); BEST Arabidopsis thaliana protein match is: Receptor-like protein
									kinase-related family protein (TAIR:AT3G21960.2)
UK	AT5G44250	TR10284	TR10284	SVVG-	NHUA-	UZWG-	HENI-	1101	Protein of unknown function DUF829, transmembrane 53; CONTAINS InterPro DOMAIN/s: Protein of unknown
				2005956	2013920	2010737	2008755		function DUF829, transmembrane 53 (InterPro:IPR008547); BEST Arabidopsis thaliana protein match is: Protein
									of unknown function DUF829, transmembrane 53 (TAIR:AT2G15695.1)
UK	AT3G10470	TR10285	TR10285	SVVG-	NHUA-	UZWG-	HENI-	229	C2H2-type zinc finger family protein; FUNCTIONS IN: sequence-specific DNA binding transcription factor activity,
				2060573	2049649	2011289	2039171		zinc ion binding, nucleic acid binding; INVOLVED IN: regulation of transcription; LOCATED IN: intracellular;
									EXPRESSED IN: petal, leaf whorl, male gametophyte, flower, pollen tube; EXPRESSED DURING: L mature pollen
									stage, M germinated pollen stage, 4 anthesis, petal differentiation and expansion stage; CONTAINS InterPro
									DOMAIN/s: Zinc finger, C2H2-like (InterPro:IPR015880), Zinc finger, C2H2-type (InterPro:IPR007087); BEST
									Arabidopsis thaliana protein match is: C2H2-type zinc finger family protein (TAIR:AT5G04390.1)
IRX3	AT5G17420	TR10336	TR10336	SVVG-	NHUA-	UZWG-	HENI-	1938	Encodes a xylem-specific cellulose synthase that is phosphorylated on one or more serine residues (on either

Name	AT	LH	LS	FS	СС	СР	QS	QR	Gene function
				2007985	2013256	2091907	2048565		S185 or one of S180 or S181). IRX3 is required for secondary cell wall biosynthesis.
OTU1	AT2G28120	TR10347	TR10347	SVVG-	NHUA-	UZWG-	HENI-	186	Major facilitator superfamily protein; INVOLVED IN: N-terminal protein myristoylation, transmembrane
				2069059	2078282	2093790	2048163		transport; LOCATED IN: plasma membrane; EXPRESSED IN: 11 plant structures; EXPRESSED DURING: 6 growth
									stages; CONTAINS InterPro DOMAIN/s: Nodulin-like (InterPro:IPR010658), Major facilitator superfamily MFS-1
									(InterPro:IPR011701), Major facilitator superfamily, general substrate transporter (InterPro:IPR016196); BEST
									Arabidopsis thaliana protein match is: Major facilitator superfamily protein (TAIR:AT2G39210.1)
PGY2	AT1G33140	TR1038	TR1038	SVVG-	NHUA-	UZWG-	HENI-	752	Encodes ribosomal protein L9. Identified in a screen for enhancers of as1. as1/pgy double mutants show defects
				2010980	2076176	2091605	2003557		in leaf vascular patterning and adaxial cell fate. Double mutant analysis indicates pgy genes function in the same
									pathway as REV, KAN1 and KAN2. The mRNA is cell-to-cell mobile.
UK	AT5G01830	TR10413	TR10413	SVVG-	NHUA-	UZWG-	HENI-	618	ARM repeat superfamily protein; FUNCTIONS IN: ubiquitin-protein ligase activity, binding; INVOLVED IN:
				2060485	2016927	2086953	2037911	-	response to chitin; LOCATED IN: ubiquitin ligase complex; EXPRESSED IN: root; CONTAINS InterPro DOMAIN/s: U
								L	box domain (InterPro:IPR003613), Armadillo-like helical (InterPro:IPR011989), Armadillo (InterPro:IPR000225),
								Cent	Armadillo-type fold (InterPro:IPR016024); BEST Arabidopsis thaliana protein match is: plant U-box 17
									(TAIR:AT1G29340.1)
UK	AT2G22795	TR10461	TR10461	SVVG-	NHUA-	UZWG-	HENI-	2311	Unknown protein; BEST Arabidopsis thaliana protein match is: unknown protein (TAIR:AT4G37820.1)
				2073255	2000346	2093812	2006803		
TMN9	AT5G25100	TR1051	TR1051	SVVG-	NHUA-	UZWG-	HENI-	4234	Endomembrane protein 70 protein family; CONTAINS InterPro DOMAIN/s: Nonaspanin (TM9SF)
				2015401	2007811	2011755	2002912		(InterPro:IPR004240); BEST Arabidopsis thaliana protein match is: Endomembrane protein 70 protein family
									(TAIR:AT5G10840.1).
PCK1	AT4G37870	TR10560	TR10560	SVVG-	NHUA-	UZWG-	HENI-	4569	Encodes a phosphoenolpyruvate carboxykinase that localizes to the cytosol.
				2008054	2015610	2000160	2047743		
UK	AT1G65780	TR10594	TR10594	SVVG-	NHUA-	UZWG-	HENI-	9151	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein; BEST Arabidopsis thaliana protein
				2001447	2062112	2085959	2037831		match is: P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein (TAIR:AT1G65810.1)
ABCB21	AT3G62150	TR1059	TR1059	SVVG-	NHUA-	UZWG-	HENI-	1285	Encodes a facultative transporter controlling auxin concentrations in plant cells.
				2005773	2072324	2012864	2050574		
UK	AT4G28690	TR10606	TR10606	SVVG-	NHUA-	UZWG-	HENI-	2429	BEST Arabidopsis thaliana protein match is: RPM1 interacting protein 13 (TAIR:AT2G20310.1)
				2066726	2074879	2012720	2047234		

Name	AT	LH	LS	FS	СС	СР	QS	QR	Gene function
ATLARP1B	AT5G66100	TR10609	TR10609	SVVG-	NHUA-	UZWG-	HENI-	315	Encodes a LAM domain containing protein that is involved in leaf senescence.
				2073618	2073606	2063911	2044183		
UK	AT3G30405	TR1060	TR1060	SVVG-	NHUA-	UZWG-	HENI-	4227	Gypsy-like retrotransposon family, has a 1.1e-154 P-value blast match to GB:AAD22153 polyprotein (Gypsy_Ty3-
				2008453	2073268	2087855	2015190		element) (Sorghum bicolor)
UK	AT4G07733	TR10615	TR10615	SVVG-	NHUA-	UZWG-	HENI-	809	Gypsy-like retrotransposon family (Athila), has a 2.5e-37 P-value blast match to GB:CAA57397 Athila ORF 1
				2065922	2002577	2004252	2037727		(Arabidopsis thaliana)
ATHY2	AT3G09150	TR10631	TR10631	SVVG-	NHUA-	UZWG-	HENI-	133	Required for biosynthesis of the tetrapyrrole phytochrome chromophore phytochromobilin. Encodes
				2058100	2008479	2079007	2006327		phytochromobilin synthase, a ferredoxin-dependent biliverdin reductase. It is necessary for coupling the
									expression of some nuclear genes to the functional state of the chloroplast.
UK	AT5G41980	TR10633	TR10633	SVVG-	NHUA-	UZWG-	HENI-	1254	CONTAINS InterPro DOMAIN/s: Putative harbinger transposase-derived nuclease (InterPro:IPR006912); BEST
				2009924	2010515	2009355	2050955		Arabidopsis thaliana protein match is: unknown protein (TAIR:AT1G43722.1)
UK	AT5G08139	TR10642	TR10642	SVVG-	NHUA-	UZWG-	HENI-	9202	RING/U-box superfamily protein; FUNCTIONS IN: zinc ion binding; INVOLVED IN: biological_process unknown;
				2068346	2016310	2001652	2009847	1	LOCATED IN: cellular_component unknown; EXPRESSED IN: 23 plant structures; EXPRESSED DURING: 13 growth
									stages; CONTAINS InterPro DOMAIN/s: Zinc finger, RING-type (InterPro:IPR001841), Zinc finger, C3HC4 RING-type
									(InterPro:IPR018957); BEST Arabidopsis thaliana protein match is: RING/U-box superfamily protein
									(TAIR:AT5G60820.1)
UK	AT5G53650	TR10656	TR10656	SVVG-	NHUA-	UZWG-	HENI-	2422	Unknown protein; FUNCTIONS IN: molecular_function unknown; INVOLVED IN: biological_process unknown;
				2062527	2051787	2071103	2040743		LOCATED IN: endomembrane system; EXPRESSED IN: 23 plant structures; EXPRESSED DURING: 15 growth stages
AHA8	AT3G42640	TR10662	TR10662	SVVG-	NHUA-	UZWG-	HENI-	6688	H(+)-ATPase 8 (HA8); FUNCTIONS IN: ATPase activity; INVOLVED IN: cation transport, metabolic process, ATP
				2006096	2073393	2004435	2010293		biosynthetic process; LOCATED IN: plasma membrane, membrane; EXPRESSED IN: 23 plant structures;
									EXPRESSED DURING: 12 growth stages; CONTAINS InterPro DOMAIN/s: ATPase, P-type, ATPase-associated
									domain (InterPro:IPR008250), ATPase, P-type cation-transporter, N-terminal (InterPro:IPR004014), Haloacid
									dehalogenase-like hydrolase (InterPro:IPR005834), ATPase, P-type, H+ transporting proton pump
									(InterPro:IPR000695), ATPase, P-type, K/Mg/Cd/Cu/Zn/Na/Ca/Na/H-transporter (InterPro:IPR001757), ATPase, P-
									type, plasma-membrane proton-efflux (InterPro:IPR006534), ATPase, P-type phosphorylation site
									(InterPro:IPR018303); BEST Arabidopsis thaliana protein match is: H(+)-ATPase 6 (TAIR:AT2G07560.1)
TWIN 2	AT1G14610	TR10681	TR10681	SVVG-	NHUA-	UZWG-	HENI-	1	Required for proper proliferation of basal cells.
Name	AT	LH	LS	FS	СС	СР	QS	QR	Gene function
--------	-----------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	------	--
				2073823	2010128	2005237	2003691		
EDS5	AT4G39030	TR10692	TR10692	SVVG-	NHUA-	UZWG-	HENI-	2550	Encodes an orphan multidrug and toxin extrusion transporter. Essential component of salicylic acid-dependent
				2009907	2004471	2091619	2000899		signaling for disease resistance. Member of the MATE-transporter family. Expression induced by salicylic acid.
									Mutants are salicylic acid-deficient.
UK	AT5G56570	TR10694	TR10694	SVVG-	NHUA-	UZWG-	HENI-	1537	Leucine-rich repeat (LRR) family protein; FUNCTIONS IN: molecular_function unknown; INVOLVED IN:
				2013909	2076632	2092829	2010830		biological_process unknown; LOCATED IN: mitochondrion; CONTAINS InterPro DOMAIN/s: FBD
									(InterPro:IPR013596), FBD-like (InterPro:IPR006566); BEST Arabidopsis thaliana protein match is: FBD, F-box and
									Leucine Rich Repeat domains containing protein (TAIR:AT5G56560.1)
ABCG42	AT4G15233	TR10735	TR10735	SVVG-	NHUA-	UZWG-	HENI-	2732	ABC-2 and Plant PDR ABC-type transporter family protein; FUNCTIONS IN: nucleoside-triphosphatase activity,
				2006055	2068480	2005065	2008623		ATPase activity, nucleotide binding, ATP binding; INVOLVED IN: biological_process unknown; LOCATED IN:
								-	membrane; CONTAINS InterPro DOMAIN/s: ATPase, AAA+ type, core (InterPro:IPR003593), ABC transporter-like
									(InterPro:IPR003439), Plant PDR ABC transporter associated (InterPro:IPR013581), ABC-2 type transporter
								1 en	(InterPro:IPR013525); BEST Arabidopsis thaliana protein match is: ABC-2 and Plant PDR ABC-type transporter
									family protein (TAIR:AT4G15236.1).
NF-YC3	AT1G54830	TR10743	TR10743	SVVG-	NHUA-	UZWG-	HENI-	602	"Nuclear factor Y, subunit C3" (NF-YC3); FUNCTIONS IN: DNA binding, sequence-specific DNA binding
				2000930	2003436	2012031	2007546		transcription factor activity; INVOLVED IN: regulation of transcription, DNA-dependent; LOCATED IN: nucleus,
									intracellular; EXPRESSED IN: 24 plant structures; EXPRESSED DURING: 15 growth stages; CONTAINS InterPro
									DOMAIN/s: Transcription factor CBF/NF-Y/archaeal histone (InterPro:IPR003958), Histone-fold
									(InterPro:IPR009072); BEST Arabidopsis thaliana protein match is: nuclear factor Y, subunit C9
									(TAIR:AT1G08970.2)
MLP423	AT1G24020	TR10750	TR10750	SVVG-	NHUA-	UZWG-	HENI-	648	MLP-like protein 423 (MLP423); INVOLVED IN: response to biotic stimulus, defense response; LOCATED IN:
				2006634	2002226	2009531	2024875		membrane; EXPRESSED IN: 23 plant structures; EXPRESSED DURING: 15 growth stages; CONTAINS InterPro
									DOMAIN/s: Bet v I allergen (InterPro:IPR000916); BEST Arabidopsis thaliana protein match is: MLP-like protein 28
									(TAIR:AT1G70830.3)
APK1	AT1G07570	TR10779	TR10779	SVVG-	NHUA-	UZWG-	HENI-	328	Protein kinase capable of phosphorylating tyrosine, serine, and threonine residues
				2072788	2013289	2002074	2053157		
UK	AT2G24617	TR108	TR108	SVVG-	NHUA-	UZWG-	HENI-	85	Unknown protein

Name	AT	LH	LS	FS	СС	СР	QS	QR	Gene function
				2069465	2055057	2086977	2042952		
UK	AT2G35790	TR10913	TR10913	SVVG-	NHUA-	UZWG-	HENI-	175	Unknown protein; CONTAINS InterPro DOMAIN/s: Protein of unknown function DUF1301 (InterPro:IPR009724)
				2011846	2015265	2011869	2006139		
SUO	AT3G48050	TR10918	TR10918	SVVG-	NHUA-	UZWG-	HENI-	92	Encodes a large protein with N-terminal bromo-adjacent homology (BAH) and transcription elongation factor S-II
				2002383	2004317	2009938	2003309		(TFS2N) domains and two C-terminal GW (glycine and tryptophan) repeats. It is nuclear and colocalizes with the
									processing-body component DCP1 in the cytoplasm. SOU is a component of the miRNA pathway and is involved
									in translational repression.
ATGSTZ1	AT2G02390	TR10941	TR10941	SVVG-	NHUA-	UZWG-	HENI-	597	Encodes glutathione transferase belonging to the zeta class of GSTs. Naming convention according to Wagner et
				2059551	2018342	2074076	2005019		al. (2002). The protein undergoes spontaneous thiolation following treatment with the oxidant tert-
									butylhydroperoxide. It functions in vitro as a maleylacetoacetate isomerase and is likely to be involved in tyrosine
								-	catabolism.
IQD9	AT2G33990	TR10947	TR10947	SVVG-	NHUA-	UZWG-	HENI-	349	IQ-domain 9 (iqd9); FUNCTIONS IN: calmodulin binding; INVOLVED IN: biological_process unknown; LOCATED IN:
				2071024	2055261	2084838	2037870	100	plasma membrane; EXPRESSED IN: 22 plant structures; EXPRESSED DURING: 13 growth stages; CONTAINS
									InterPro DOMAIN/s: IQ calmodulin-binding region (InterPro:IPR000048); BEST Arabidopsis thaliana protein match
									is: IQ-domain 10 (TAIR:AT3G15050.1)
UK	AT5G63490	TR10952	TR10952	SVVG-	NHUA-	UZWG-	HENI-	201	CBS / octicosapeptide/Phox/Bemp1 (PB1) domains-containing protein; EXPRESSED IN: 24 plant structures;
				2001954	2074588	2006420	2008679		EXPRESSED DURING: 15 growth stages; CONTAINS InterPro DOMAIN/s: Octicosapeptide/Phox/Bem1p
									(InterPro:IPR000270), Cystathionine beta-synthase, core (InterPro:IPR000644); BEST Arabidopsis thaliana protein
									match is: CBS / octicosapeptide/Phox/Bemp1 (PB1) domains-containing protein (TAIR:AT5G50530.1)
CRK21	AT4G23290	TR11004	TR11004	SVVG-	NHUA-	UZWG-	HENI-	4326	Encodes a cysteine-rich receptor-like protein kinase.
				2010103	2009454	2003515	2001358		
SSP4	AT5G46410	TR11047	TR11047	SVVG-	NHUA-	UZWG-	HENI-	3907	Encodes a SCP1-like small phosphatase (SSP). Three SSPs form a unique group with long N-terminal extensions:
				2072672	2016812	2092181	2051484		AT5G46410 (SSP4), AT5G11860 (SSP5), AT4G18140 (SSP4b). SSP4 and SSP4b were localized exclusively in the
									nuclei, whereas SSP5 accumulated in both nuclei and cytoplasm. All three SSPs encodes active CTD phosphatases
									like animal SCP1 family proteins, with distinct substrate specificities: SSP4 and SSP4b could dephosphorylate both
									Ser2-PO(4) and Ser5-PO(4) of CTD, whereas SSP5 dephosphorylated only Ser5-PO(4). The mRNA is cell-to-cell
									mobile.

Name	AT	LH	LS	FS	СС	СР	QS	QR	Gene function
UK	AT1G72820	TR11050	TR11050	SVVG-	NHUA-	UZWG-	HENI-	1017	Mitochondrial substrate carrier family protein; FUNCTIONS IN: binding; INVOLVED IN: transport, mitochondrial
				2010716	2008531	2008294	2051471	7	Transport, transmembrane transport; LOCATED IN: mitochondrial inner membrane, membrane; EXPRESSED IN:
									23 plant structures; EXPRESSED DURING: 13 growth stages; CONTAINS InterPro DOMAIN/s: Mitochondrial carrier
									protein (InterPro:IPR002067), Mitochondrial substrate carrier (InterPro:IPR001993), Mitochondrial
									substrate/solute carrier (InterPro:IPR018108); BEST Arabidopsis thaliana protein match is: Mitochondrial
									substrate carrier family protein (TAIR:AT5G26200.1)
UK	AT1G36320	TR11071	TR11071	SVVG-	NHUA-	UZWG-	HENI-	597	Unknown protein; BEST Arabidopsis thaliana protein match is: unknown protein (TAIR:AT4G37920.1)
				2013255	2016615	2012367	2050728		
ACX3	AT1G06290	TR11089	TR11089	SVVG-	NHUA-	UZWG-	HENI-	61	Encodes an acyl-CoA oxidase with specificity for medium chain fatty acids. The mRNA is cell-to-cell mobile.
				2015366	2016338	2094076	2005883		
SPL13	AT5G50570	TR11091	TR11091	SVVG-	NHUA-	UZWG-	HENI-	4512	Squamosa promoter-binding protein-like (SBP domain) transcription factor family protein; FUNCTIONS IN: DNA
				2013605	2077442	2003890	2052320		binding, sequence-specific DNA binding transcription factor activity; INVOLVED IN: regulation of transcription;
								1	LOCATED IN: nucleus; CONTAINS InterPro DOMAIN/s: Transcription factor, SBP-box (InterPro:IPR004333); BEST
									Arabidopsis thaliana protein match is: Squamosa promoter-binding protein-like (SBP domain) transcription factor
									family protein (TAIR:AT5G50670.1)
UK	AT5G13660	TR11096	TR11096	SVVG-	NHUA-	UZWG-	HENI-	1525	Unknown protein; FUNCTIONS IN: molecular_function unknown; INVOLVED IN: biological_process unknown;
				2012851	2015568	2092727	2006431		LOCATED IN: cellular_component unknown; BEST Arabidopsis thaliana protein match is: unknown protein
									(TAIR:AT5G59830.2)
UK	AT4G02120	TR11100	TR11100	SVVG-	NHUA-	UZWG-	HENI-	91	CTP synthase family protein; FUNCTIONS IN: CTP synthase activity, catalytic activity; INVOLVED IN: pyrimidine
				2014340	2078149	2092361	2053307		ribonucleotide metabolic process, pyrimidine nucleotide biosynthetic process; LOCATED IN: endomembrane
									system; EXPRESSED IN: 24 plant structures; EXPRESSED DURING: 13 growth stages; CONTAINS InterPro
									DOMAIN/s: Glutamine amidotransferase class-I, C-terminal (InterPro:IPR000991), CTP synthase
									(InterPro:IPR004468), CTP synthase, N-terminal (InterPro:IPR017456), Glutamine amidotransferase type 1
									(InterPro:IPR017926); BEST Arabidopsis thaliana protein match is: CTP synthase family protein
									(TAIR:AT3G12670.1)
UK	AT1G61970	TR11273	TR11273	SVVG-	NHUA-	UZWG-	HENI-	9406	Mitochondrial transcription termination factor family protein; CONTAINS InterPro DOMAIN/s: Mitochodrial
				2013762	2077510	2010234	2046704		transcription termination factor-related (InterPro:IPR003690); BEST Arabidopsis thaliana protein match is:

Name	AT	LH	LS	FS	СС	СР	QS	QR	Gene function
									Mitochondrial transcription termination factor family protein (TAIR:AT1G61980.1)
UK	AT4G03876	TR11274	TR11274	SVVG-	NHUA-	UZWG-	HENI-	309	Pseudogene, hypothetical protein
				2066881	2077794	2092947	2051441		
THA1	AT1G08630	TR1128	TR1128	SVVG-	NHUA-	UZWG-	HENI-	1357	Encodes a threonine aldolase, involved in threonine degradation to glycine. Primarily expressed in seeds and
				2001020	2010662	2092134	2009448		seedlings.
ATNRAM	AT1G47240	TR11292	TR11292	SVVG-	NHUA-	UZWG-	HENI-	936	Member of the NRAMP2 gene family of metal ion transporters.
P2				2010553	2075796	2092690	2002164		
AP2M	AT5G46630	TR11307	TR11307	SVVG-	NHUA-	UZWG-	HENI-	2584	Clathrin adaptor complexes medium subunit family protein, contains Pfam profile: PF00928 adaptor complexes
				2072349	2007955	2011880	2000821		medium subunit family; similar to micro-adaptins of clathrin coated vesicle adaptor complexes

UK:尚無基因名稱縮寫,AT: Arabidopsis accession number,LH: L. hanceii,LS: L. shinsuiensis,FS: F. sylvatica,QS: Q. shumardii,QR: Q. robur,CC: C. crenata, CP: C. pumila。同源基因比對自1KP 資料庫(SVVG-F. sylvatica; HENI-Q. shumardii; NHUA-C. crenata; UZWG-C. pumila)與Quercus Portol (Q. robur_accession number)



《二 里廷放干杆税涿腩际用使用之円际坐凹及里廷復之税 %	15關係
-------------------------------------	------

OG	Method	Tree topology	SM
AT1G36320*	NJ	(((((QS,QR),LS),LH),(CC,CP)),FS)	Т92
	ML	((((QS,QR),(LS,LH)),(CC,CP)),FS)	HKY+G
	BI	((((QS,QR),(CC,CP),LS),LH),FS)	HKY+G
AT1G54830*	NJ	((((LS,QR,QS),LH),(CC,CP)),FS)	K2P
	ML, BI	(((QS,QR,LS,LH),(CC,CP)),FS)	K2P
AT1G61970*	NJ	(((((LH,LS),QS,QR),CP),CC),FS)	HKY+G
	ML, BI	((((QS,LS),LH,QR),(CC,CP)),FS)	HKY+G
AT1G72820*	NJ	((((LH,LS),QS,QR),(CC,CP)),FS)	HKY+G
	ML, BI	((((QS,LS),LH,QR),(CC,CP)),FS)	HKY+G
AT2G24617*	NJ, BI	((((LH,LS),QS,QR),(CC,CP)),FS)	JC
	ML	(((LH,LS),QR,QS,(CC,CP)),FS)	JC
AT4G02120*	NJ	((((LH,LS),(QS,QR)),(CC,CP)),FS)	Т92
	ML	((((LH,LS),QS,QR),CP,CC),FS)	K2P
	ВІ	((((LH,LS),(QS,QR)),CC,CP),FS)	K2P
AT4G03876*	NJ, ML, BI	((((LH,LS),(QS,QR)),(CC,CP)),FS)	НКҮ
AT4G28690*	NJ, ML, BI	(((LH,LS),(QS,QR),(CC,CP)),FS)	НКҮ
AT4G39410*	NJ	(((((LH,LS),QS),QR),(CC,CP)),FS)	JC
	ML, BI	((((L <mark>H</mark> ,LS),QS,Q <mark>R</mark>),(CC,CP)),FS)	JC
AT5G01830*	NJ	((((LH,LS),(QS,QR)),CC,CP),FS)	JC
	ML, BI	((((LH,LS),QS,QR),CC,CP),FS)	JC
AT5G04990*	NJ	(((LH,LS),QR,QS,(CC,CP)),FS)	TN93+G
	ML	((((LH,LS),QS,QR),(CC,CP)),FS)	TN93+G
	BI	(((((LH,LS),QR),QS),(CC,CP)),FS)	HKY+G
AT5G17420*	NJ	((((LH,LS),QR,QS),(CC,CP)),FS)	К2Р
	ML, BI	((((LH,LS,QR),QS),(CC,CP)),FS)	К2Р
AT5G56570*	NJ, BI	((((LH,LS),QS,QR),(CC,CP)),FS)	K2P+G
	ML	(((LH,LS),((QS,QR),(CC,CP))),FS)	K2P+G
AT5G66100*	NJ, ML, BI	(((LH,LS,QS,QR),(CC,CP)),FS)	НКҮ
AT5G06130*	NJ	((((LH,LS),QR,QS),(CC,CP)),FS)	Т92
	ML, BI	((((LH,LS),QR,QS),(CC,CP)),FS)	K2P
AT1G06290	NJ	((((LH,LS),(CC,CP)),QR,QS),FS)	T92+G
	ML, BI	(((((LH,LS),(CC,CP)),QR),QS),FS)	K2P+G
AT2G35790	NJ	(((LH,LS,CC,CP),(QS,QR)),FS)	JC
	ML, BI	(((LH,LS,(CC,CP)),QS,QR),FS)	JC
AT5G13660	NJ	(((LH,LS),(CC,CP),QS,QR),FS)	T92+G
	ML, BI	((((LH,LS),(QS,QR)),(CC,CP)),FS)	HKY+G

AT5G46410	NJ	((((LH,LS,(CC,CP),QS),QR),FS)	T92
	ML, BI	((((((CC,CP),LS),LH),QS),QR),FS)	НКҮ
AT1G33140	NJ	(((CC,CP),(QS,QR)),(LH,LS)),FS	НКҮ
	ML	((((((CC,CP),QS),QR),LH),LS),FS)	НКҮ
	BI	(((((CC,CP),QS),QR),(LH,LS)),FS)	НКҮ
AT2G31620	NJ	((((((CC,CP),QR),QS),LH),LS),FS)	НКҮ
	ML, BI	((((CC,CP),QR),QS,LS,LH),FS)	НКҮ
AT3G10470	NJ	(((((CC,CP),QS,QR),LS),LH),FS)	K2P
	ML, BI	((((CC,CP),QS,QR,LS),LH),FS)	K2P
AT4G37870	NJ	(((((CC,CP),QR),QS),(LH,LS)),FS)	T92
	ML, BI	(((LH,LS),(CC,CP),QS,QR),FS)	K2P
AT5G08139	NJ	(((((CC,CP),QS),QR),(LH,LS)),FS)	K2P
	ML	((((CC,CP),QS,QR),(LH,LS)),FS)	K2P
	BI	(((LH,LS),(CC,CP),QS,QR),FS)	K2P
AT5G46630	NJ	((((CC,CP),(QS,QR)),(LH,LS)),FS)	T92+G
	ML, BI	((((CC,CP),(QS,QR)),(LH,LS)),FS)	HKY+G
AT1G02020	NJ, BI	(((((CC,CP),QS),LH),(LS,QR)),FS)	K2P
	ML	((((LH,LS),QR),(CC,CP,QS)),FS)	K2P
AT1G07570	NJ	(((CC,CP),LH,L <mark>S,</mark> QS,QR),FS)	Т92
	ML, BI	(((C <mark>C,</mark> CP),LH,L <mark>S,</mark> QS,QR),FS)	K2P
AT1G08630	NJ	((LH,LS,QS,QR,CC,CP),FS)	T92+G
	ML	(((((LH,LS),(CC,CP)),QS),QR),FS)	HKY+G
	BI	(((CC,CP),LH,LS,QS,QR),FS)	HKY+G
AT1G24020	NJ	((((LH,QR),(LS,CC)),(CP,QS)),FS)	Т92
	ML, BI	((((LH,QR),(CP,QS)),(LS,CC)),FS)	K2P
AT1G47240	NJ	(((LH,LS,QR),((QS,CC),CP)),FS)	Т92
	ML	((((LH,LS),QR),(CC,CP,QS)),FS)	K2P
	BI	(((LH,LS,QR),(QS,CC,CP)),FS)	K2P
AT1G65780	NJ, ML, BI	((((LH,LS),QS,CP,QR),CC),FS)	JC
AT2G22795	NJ, BI, ML	(((((CC,CP),QR),(LH,LS)),QS),FS)	TN93
AT2G33990	NJ, JC	(((LS,LH,QR,QS,CP),CC),FS)	JC
AT3G09150	NJ	((((LH,LS),(CC,QS),QR),CP),FS)	K2P+G
	ML, BI	(((((LH,LS),QR),(CC,QS)),CP),FS)	K2P+G
AT3G30405	NJ	(((((LH,LS),QR),(CC,CP)),QS),FS)	T92+I
	ML	((((((LH,LS),QR),QS),CP),CC),FS)	HKY+G
	BI	(((((LH,LS),QR),,CC,CP),QS),FS)	HKY+G
AT3G42640	NJ	((((((LH,LS),QR),CC),QS),CP),FS)	T92+G
	ML, BI	((((((LH,LS),QR),CC),QS),CP),FS)	K2P+I

AT3G48050	NJ	(((((CC,CP),LS,QR),LH),QS),FS)	T92+G
	ML, BI	(((((CC,CP),LS,QR),LH),QS),FS)	K2P+G
AT3G62150	NJ	(((LH,LS,CC,QR),CP,QS),FS)	T92+G
	ML	(((((LH,LS,QR),QS),CC),CP),FS)	K2P+G
	BI	(((LH,LS,QR),CC),(CP,QS)),FS)	K2P+G
AT4G07733	NJ	((((CC,QR),LH,LS),(CP,QS)),FS)	JC+G
	ML	((((CP,QS),QR,CC),LH,LS),FS)	JC+G
	BI	((((LH,LS),QR,CC),(CP,QS)),FS)	JC+G
AT4G15233	NJ, ML, BI	(((((LH,CC,QR),LS),CP),QS),FS)	K2P
AT4G39030	NJ, ML, BI	((((LH,LS),QR),((CP,CC),QS)),FS)	JC
AT5G25100	NJ, ML, BI	((((CP,CC),QS,QR,LH),LS),FS)	K2P
AT5G41980	NJ, ML, BI	((((LH,LS,QR),(CC,CP)),QS),FS)	K2P
AT5G44250	NJ, NL, BI	(((CP,QR),LH,LS,CC,QS),FS)	JC
AT5G50570	NJ	((((CC,CP),QR),LS,LH,QS),FS)	K2P+G
	ML	((((CC,CP),(QS,QR)),(LH,LS)),FS)	K2P+G
	BI	((((LH,LS),(QS,QR)),(CC,CP)),FS)	K2P+G
AT5G53650	NJ	((((CC,QR),LH,LS,QS),CP),FS)	JC
	ML, BI	(((LH,LS,QS,QR,CC),CP),FS)	JC
AT5G63490	NJ	((((LH,LS),(CP,QS)),(CC,QR)),FS)	K2P
	ML, BI	((((L <mark>H</mark> ,LS),QS, <mark>CP</mark>),(CC,QR)),FS)	K2P
AT1G14610	NJ	((((LH,LS),QR),((CC,CP),QS)),FS)	K2P
	ML, BI	((((LH,LS),QR),(CC,CP,QS)),FS)	K2P
AT2G28120	NJ, ML, BI	((((LH,LS),QS),(CC,CP),QR),FS)	JC
AT4G23290	NJ	((((LH,LS),QR),(CC,CP),QS),FS)	T92+G
	ML, BI	((((LH,LS),QR),(CC,CP),QS),FS)	K2P+G

物種間重建的關係以 cladogram 表示;物種簡稱:LH:L. hanceii,LS:L. shinsuiensis, CC:C. crenata, CP:C. pumila, QS:Q. shumardii,Q. robur, FS:F. sylvatica;核苷酸置換 模型簡稱:HKY: Hasegawa-Kishino-Yano、JC:Jukes-Cantor、K2P: kimura 2-parameter、 T92: Tamura 3-parameter、TN93: Tamura and Nei 1993、+G: gamma distribution、+I: proportion of invariable sites。其它縮寫:OG: orthologous gene、NJ: neighbor-joining、 ML: maximum likelihood、BI: Bayesian inference。標示*代表所使用與阿拉伯芥同 源的同源基因。

表四、參考基因 K 值與目標基因 K 值、Ka 值、Ks 值之 T 檢定。

K _R vs. K _T	Mean of K_R	Mean of K_T	t value	<i>p</i> value
K _R vs. K _{CER1}	0.011±1.05E-05	0.011±3.23E-05	0.237	0.813
K _R vs. K _{CER3}	0.011±1.05E-05	0.007±1.36E-05	9.838	5.18E-19
K _R vs. K _{CER5}	0.011±1.05E-05	0.001±2.72E-05	2.952	0.003
K _R vs. K _{CER7}	0.011±1.05E-05	0.013±2.21E-05	-3.501	0.001
K_R vs. KS_T	Mean of K_R	Mean of KS_T	t value	<i>p</i> value
K _R vs. KS _{CER1}	0.011±1.05E-05	0.020±1.99E-04	-7.515	2.67E-12
K _R vs. KS _{CER3}	0.011±1.05E-05	0.016±9.39E-05	-5.162	5.83E-07
K _R vs. KS _{CER5}	0.011±1.05E-05	0.013±6.46E-05	-3.037	0.003
K _R vs. KS _{CER7}	0.011±1.05E-05	0.041±2.44E-04	-18.078	5.61E-33
KAT vs. KST	Mean of KA_T	Mean of KS_T	t value	<i>p</i> value
KA _{CER1} vs. KS _{CER1}	0.009±1.66E-05	0.020±1.99E-04	-9.896	1.18E-18
KA _{CER3} vs. KS _{CER3}	0.004±4.72E-06	0.016±9.39E-05	-14.494	2.74E-31
KA _{CER5} vs. KS _{CER5}	0.009±2.21E-05	0.013±6.46E-05	-7.152	4.59E-12
KA _{CER7} vs. KS _{CER7}	0.005±6.54E-06	0.042±2.44E-04	-21.901	6.60E-39

K_R: 參考基因的核苷酸置換率, K_{CER1}: CER1 的核苷酸置換率, K_{CER3}: CER3 的核苷酸置换率, K_{CER5}: CER5 的核苷酸置换率, K_{CER7}: CER7 的核苷酸置换率, K_A_{CER1}: CER1 的非同義置換 率, K_A_{CER3}: CER3 的非同義置換率, K_A_{CER5}: CER5 的非同義置換率, K_A_{CER7}: CER7 的非同義 置換率, K_S_{CER1}: CER1 的同義置換率, K_S_{CER3}: CER3</sub> 的同義置換率, K_S_{CER5}: CER5 的同義置 換率, K_S_{CER7}: CER7 的同義置換率。*為 p<0.05。

表五、PAML 與 HyPhy 之 Site model 檢測結果

Gene	Site (w>1)	PAML s	ite model		HyPhy	
		M2a	M8	REL	FUBAR	MEME [#]
CER1	36 R	0.937	0.965*	364.024ª	0.841	0.311
	46 F	0.903	0.944	471.068ª	0.878	0.284
	94 L	0.992**	0.997**			
	102 V	0.928	0.960*	20430.6ª	0.965 ^b	0.166
	104 T	0.938	0.966*			
	122 L	0.982*	0.994**	237.102ª	0.759	0.499
	124 I	0.989*	0.996**			
	196 I	0.903	0.943	874.648ª	0.933 ^b	0.167
	208 F	0.988*	0.996**	749.212ª	0.913 ^b	0.228
	266 V	0.992**	0.998**	794.516ª	0.93 ^b	0.227
	274 H	0.911	0.949	753.22ª	0.903 ^b	0.303
	309 F	0.950*	0.974*	1000.74ª	0.962 ^b	0.129
	369 W	0.960*	0.979*			
	372 E	0.992**	0.998**	35487.9ª	0.972 ^b	0.174
	497 Y	0.925	>0.5	836.053ª	0.92 ^b	0.148
	520	>0.5	>0.5	733.558ª	0.927 ^b	0.158
CER3	50 L	0.999**	1.000**			
	346 S	0.947	0.974*			
	437 N	0.905	0.954*			
	477 S	0.959*	0.980*			
	484 Q	0.956*	0.978*			
	570 A	0.999**	1.000**	1.576	0.927 ^b	0.259
CER5	16 G	0.951*	0.952*	38448.2ª	0.941 ^b	0.255
	19 G	0.95	0.951*	37391.7ª	0.938 ^b	0.083 ^c
	20 E	0.968*	0.970*	28633.6ª	0.935 ^b	0.207
	30 R	0.949	0.950*	232.962ª	0.73	0.466
	41 V	0.936	0.937	38033.7ª	0.942 ^b	0.23
	42 L	0.692	0.614	280.381ª	0.785	0.33
	49	>0.5	>0.5	221.109 ^a	0.715	0.481
	110 D	0.671	0.59	227.901 ^a	0.745	0.389
	147 I	0.998**	0.999**	1200.19ª	0.75	0.67
	170 L	0.687	0.609	282.511ª	0.784	0.346
	179 I	0.625	0.538	291.078ª	0.773	0.384
	226 H	0.621	0.533	246.176ª	0.757	0.414
	231 I	0.932	0.933	28246.4ª	0.934 ^b	0.291

Gene	Site (w>1)	PAML si	te model		HyPhy	
		M2a	M8	REL	FUBAR	MEME [#]
	298 V	0.946	0.948	256.429 ^a	0.756	0.404
	299 T	0.942	0.943	33083.7ª	0.941 ^b	0.279
	301 A	0.59	>0.5	249.867 ^a	0.773	0.378
	328 I	1.000**	1.000**	71049.1 ^a	0.972 ^b	0.018 ^c
	336 W	0.977*	0.979*	4452.07 ^a	0.909 ^b	0.307
	348 Q	0.978*	0.980*	338.08 ^{1a}	0.808	0.291
	352 T	0.685	0.606	248.29 ^a	0.768	0.332
	367 T	0.972*	0.974*	74852.2 ^a	0.948 ^b	0.193
	377 Q	0.747	0.679	270.857 ^a	0.779	0.397
	396 I	0.66	0.577	257.891 ^a	0.761	0.341
	399 A	0.994**	0.996**	38415.8ª	0.945 ^b	0.258
	479 I	0.934	0.935	29319.9 ^a	0.938 ^b	0.277
	504 S	0.997**	0.998**	106246 ^a	0.968 ^b	0.152
	508 Y	0.606	0.516	276.685 ^a	0.751	0.452
	513 V	0.514	>0.5	170.898 ^a	0.293	0.67
	538	>0.5	>0.5	261.916ª	0.758	0.4
	554 E	0.995**	0.997**	11269.7ª	0.914 ^b	0.409
	559 F	0.51	>0.5	237.039 ^a	0.731	0.355
	583	>0.5	>0.5	261.865ª	0.761	0.407
	605 N	0.95	0.951*	11684.7ª	0.916 ^b	0.401
	623 V	0.684	0.605	262.641 ^a	0.768	0.212
	640 K	0.659	0.576	235.312 ^a	0.752	0.201
	648 Q	0.998**	0.999**	279.115 ^a	0.785	0.332
	652 T	0.501	>0.5	247.889 ^a	0.767	0.392
	658 R	0.996**	0.998**	18862.3ª	0.928 ^b	0.338
	671 F	0.671	0.59	241.416 ^a	0.757	0.139
	674 N	0.601	0.512	232.125ª	0.738	0.455
	678 P	0.602	0.512	243.7 ^a	0.779	0.395
CER7	278 G	0.969*	0.990*			
	287 Q	0.976*	0.992**	740.107 ^a	0.931 ^b	0.182
	289 G	0.881	0.950*	61.233ª	0.711	0.6

所使用之檢測模型為 PAML 的 site model (M2a, M8)及 HyPhy 的 site-based model (REL, FUBAR)與 branch-site model (MEME)。胺基酸位點標記粗體者為同時在 PAML 的 M2a、M8 檢測到 ω>1 的位點;*為 BEB>0.95,**為 BEB>0.99; ª為 REL 檢測中 Bayes Factor>50 者;^b為 FUBAR 檢測中 posterior probability>0.9者;^c為 MEME 檢測中 *p* value<0.05者;[#]為 branch-site based model。

Species	Waxy	PA	Y (II)	$\delta^{13}C$	$\delta^{\rm 15} N$
L. amygdalifolius	WC	44.90±6.10	0.771±0.027	-31.076	-0.856
L. brevicaudatus	NWC	46.02±3.90	0.681±0.018	-31.018	-0.862
L. cornea	NWC	78.24±11.15	0.700±0.038	-30.654	-0.510
L. dodonaeifolius	WC	45.25±2.14	0.746±0.033	-31.254	-1.618
L. formosanus	WC	49.08±7.58	0.701±0.021	-31.833	-1.393
L. glaber	WC	44.94±32.83	0.738±0.027	-30.451	-0.499
L. hanceii	NWC	29.82±6.30	0.744±0.025	-33.455	-0.964
L. harlandii	NWC	32.13±4.60	0.727±0.025	-31.962	-1.589
L. kawakaii	NWC	37.43±7.85	0.735±0.040	-32.413	-0.512
L. konishii	NWC	54.28±2.88	0.665±0.054	-30.841	1.125
L. lepidocarpus	WC	59.00±4.71	0.770±0.025	-31.334	-0.606
L. nantoensis	WC	81.66±3.45	0.629±0.250	-31.844	-2.622
L. shinsuiensis	WC	127.85±50.79	0.745±0.031	-30.893	-1.509
L. taitoensis	WC	35.00±3.19	0.724±0.047	-32.009	-0.763

表六、生理生態數值之檢測數值

PA: phenolic acid, 酚酸; Y (II): 光系統 II 之光化學產率; δ¹³C:碳穩定同位素(‰); δ¹⁵N:穩定氮同位素(‰); Waxy: wc, wax crystal、nwc, non-wax crystal。



Species tree	Ι	<i>p</i> -value	C _{mean}	<i>p</i> -value	К	<i>p</i> -value
Phenolic acid	-0.179	0.876	0.264	0.076	0.189	0.780
Y (II)	-0.173	0.704	-0.113	0.758	0.261	0.549
δ ¹³ C (‰)	0.072	0.181	0.120	0.219	0.446	0.136
δ ¹⁵ N (‰)	0.129	0.082	0.236	0.070	0.458	0.125
CER1 tree	1	<i>p</i> -value	Cmean	<i>p</i> -value	К	<i>p</i> -value
Phenolic acid	0.081	0.112	0.193	0.090	0.430	0.053
Y (II)	0.255	0.047*	0.327	0.042*	0.181	0.314
δ ¹³ C (‰)	-0.011	0.304	0.037	0.371	0.353	0.070
δ ¹⁵ N (‰)	0.220	0.016*	0.368	0.007*	0.355	0.076
CER3 tree	Ι	<i>p</i> -value	C _{mean}	<i>p</i> -value	К	<i>p</i> -value
Phenolic acid	0.335	0.016*	0.388	0.021*	0.465	0.013*
Y (II)	-0.078	0.488	-0.004	0.448	0.214	0.199
δ ¹³ C (‰)	-0.024	0.369	0.016	0.435	0.205	0.261
δ ¹⁵ N (‰)	0.235	0.009*	0.348	0.006*	0.254	0.132
CER5 tree	Ι	<i>p</i> -value	Cmean	<i>p</i> -value	К	<i>p</i> -value
Phenolic acid	0.123	0.113	0.170	0.112	0.055	0.905
Y (II)	-0.027	0.355	0.071	0.321	0.205	0.147
δ ¹³ C (‰)	0.092	0.160	0.137	0.201	0.206	0.113
δ ¹⁵ N (‰)	0.083	0.137	0.231	0.080	0.196	0.144
CER7 tree	1	<i>p</i> -value	Cmean	<i>p</i> -value	К	<i>p</i> -value
Phenolic acid	0.080	0.142	0.162	0.189	0.738	0.099
Y (II)	0.151	0.100	0.365	0.022*	1.122	0.005*
δ ¹³ C (‰)	0.256	0.023*	0.285	0.053	0.668	0.120
δ ¹⁵ N (‰)	0.079	0.143	0.251	0.060	0.538	0.254

表七、根據參考基因與目標基因的親緣關係檢測生理生態特徵是否具親緣訊息

*表示 p 值<0.05,表顯著。1: Moran's 1; C_{mean}: Abouheif 's C_{mean}; K: Blomberg's K。Y (II):光系統 II 光化學產率。

表八、各項生理生態數值對應蠟塊有/無之邏輯迴歸分析

Eco-Phy.	LD	R ²	<i>p</i> -value
Phenolic acid	1.34	0.07	0.25
Y (II)	0.88	0.05	0.35
δ ¹³ C (‰)	0.86	0.46	0.35
δ ¹⁵ N (‰)	2.77	0.15	0.10

LD: LogLikelihood difference ; *: $p < 0.05 \circ R^2$: R square \circ



		cer1	cer3	cer5	cer7
site model					
M1a	lnL	-2945.73	-2914.21	-3507.42	-1989.77
M2a	lnL	-2926.15	-2903.01	-3476.09	-1986.79
	2∆L	39.17	22.39	62.65	5.95
	df	1	1	1	1
	р	3.13E-09	1.37E-05	2.49E-14	0.051
M7	lnL	-2949.13	-2914.43	-3507.63	-1989.79
M8	lnL	-2926.15	-2903.05	-3476.10	-1986.80
	2∆L	45.97	22.75	63.08	5.97
	df	1	1	1	1
	р	1.04E-10	1.15E-05	2.01E-14	0.050
M8a	lnL	-2945.73	-2914.21	-3507.42	-1989.77
M8	lnL	-2926.15	-2903.05	-3476.10	-1986.80
	2∆L	39.17	22.31	62.64	5.94
	df	1		1	1
	р	3.89E-10	2.32E-06	2.48E-15	0.015
Branch model (froe	ground	d=wax spe <mark>c</mark> ies, S	Scenario 1)		
One ratio	lnL	-2969.33	-2923.21	-3516.91	-2009.03
Two or more ratio	lnL	-2965.95	-2923.04	-3516.58	-2008.25
	2∆L	6.75	0.34	0.67	1.56
	df	1	1	1	1
	р	0.009ª	0.561	0.413	0.211
Neutral model	lnL	-2967.84			
Two or more ratio	lnL	-2965.95			
	2∆L	3.77			
	df	1			
	р	0.052 ^b			
Branch model (fore	ground	l=non-wax spec	cies, Scenario 2)		
One ratio	lnL	-2969.33	-2923.21	-3516.91	-2009.03
Two or more ratio	lnL	-2969.32	-2923.13	-3516.91	-2007.66
	2∆L	0.01	0.15	10E-03	2.73
	df	1	1	1	1
	р	0.919	0.696	0.921	0.098
Branch model (fore	ground	l=mixed, scenai	rio 3)		
One ratio	lnL	-2969.33	-2923.21	-3516.91	-2009.03
Two or more ratio	InL	-2967.98	-2923.21	-3516.91	-2007.66

表九、PAML 檢測蠟相關生合成基因的結果

		cer1	cer3	cer5	cer7
	2ΔL	2.69	0.00	0.00	2.73
	df	2	2	2	2
	р	0.260	NA	1.000	0.255
Branch-site mode	el (froegro	ound=wax speci	ies, scenario 1)		
Model A (fixed ω	=1) lnL	-2947.11	-2914.21	-3495.95	-1989.45
Model A	lnL	-2945.73	-2914.21	-3495.95	-1989.39
	2ΔL	2.75	0	2E-06	0.13
	df	1	1	1	1
	р	0.097	1.000	0.999	0.715
Branch-site mode	el (foregro	ound=non-wax	species, Scenario	o 2)	
Model A (fixed ω	=1) lnL	-2945.73	-2914.21	-3495.89	-1989.77
Model A	lnL	-2945.73	-2914.21	-3495.52	-1989.77
	2ΔL	0	1E-04	0.74	0
	df	1	1	1	1
	р	1.000	0.991	0.391	1.000

^a 為 One ratio model (Null) vs. Scenario 1 (Alternative)比較中,*CER1* 在 One ratio model 的 ω =0.519,two or more ratio model 中 foreground ω =999.0、background ω =0.4616; ^b 為 Neutral model (Null) vs. Scenario 1 (Alterantive)比較中,*CER1* 在 Neutral model 中 foreground ω =1.000、background ω =0.460。

附錄

附錄一、核酸萃取步驟

- 1. 於 2 毫升微量離心管中加入 0.85 毫升之 CTAB 緩衝液
- 將液態氮倒入滅菌過的研缽中降溫再加入約 100mg 的葉片樣本,將磨碎後的 樣本置入 CTAB 緩衝液中,加熱 20-30 分鐘。
- 3. 加入等量的氯仿-異戊醇(24:1)上下搖晃 30 秒。
- 4. 4°C, 11000xg, 離心 10 分鐘。
- 5. 吸取上清液並移至新的2毫升的微量離心管中,並加入等量的氯仿重複步驟
 3-步驟4。
- 6. 吸取上清液, 並加入 3 倍的 10M 氯化鋁, 插置冰上沉澱核酸 30 分鐘。
- 7. 4°C,21000xg,離心20分鐘。
- 8. 倒掉上清液後以 70%酒精清洗管底白色 pellet 兩次,晾乾待酒精揮發 10-20 分鐘。
- 9. 將 pellet 回溶至 20 µL 二次水中或 DEPC 處理後的二次水中。(DNA 步驟至此)
- 10. 加入1毫升之 Trizol,輕搖 10 秒,使其均質。
- 11. 加入 0.2 毫升之氯仿, 劇烈上下搖晃 30 秒。
- 12. 靜置 2-3 分鐘使 RNA、DNA、及蛋白質分層。
- 13.4°C, 12000xg, 離心 15 分鐘。
- 14. 取上清液 350-400 µL, 加入等量 100%異丙醇, 室溫沉澱 10 分鐘。
- 15.4°C,12000xg,離心10分鐘。
- 16. 倒掉上清液,將 pellet 以 70%酒精清洗 2 次,晾乾待酒精揮發 10-20 分鐘。
- 17. 將 pellet 回溶至 DEPC 處理過的 20µL 二次水中。

附錄二、目標基因與參考基因引子及 PCR 的 Tm 條件

Primer	Sequence	Tm(°C)
fagaSAHH-F	CAAGTTCTAACCCTTGAGGATG	52
fagaSAHH-R	CTTCTCAGTACCTGTAGTGA	
FagaSAM-F	CCATTTGCTACTATACTCTTGG	56
FagaSAM-r	GGTCTTGATGCTGACAACTGC	
FagadGd-F	CTCGCTTTCCCTCATCATAGC	58
FagadGd-R	GGAGGAGCTGGATTCATTGG	
FagaCAP-F	CTTGCAGTGGGTGTCACTGAG	56
FagaCAP-R	GCAGGTGTGAGTACATTGGCAG	
FagaESRK-F	GATTCTTCGGGGGGCTAAAGT	55
FagaESRK-R	GTGTGAGGGGAGTTGGCGAA	
fagaFAD-F1	CAGGTTGRAGAACAATGGGTG	52
fagaFAD-R1	GCCTGGWGGATTGTTRAGGT	
CER1_F1	ATGGCTACYAAACCWGGWAT	54
CER1_R1	ATCCCAGCWATACGCCAAGC	
CER3_F1	ATGGTTGMTWCTTYGTCAGG	53
CER3_R1	ACCRTGTTTTAATGCWGCTTC	
CER5_F1	ACASTATGGAGATWGAGRTAGCT	52
CER5_R1	TGCTTCTAGTGGAGAGGAG	
CER7_F1	CGTTTAACAGTGAACGAGAAG	55
CER7_R3	CCTCCACTRGTGARAGATG	

附錄三、數據來源與提供者

數據	提供者
酚酸	黄盟元 (中國文化大學園藝暨生物技術學系)
葉表蠟結晶形態資訊	楊智凱 (國立臺灣師範大學生命科學系)
FAD、SAM、SAHH 基因序列	黃秉宏 (國立臺灣師範大學生命科學系)
石櫟屬轉錄體組	黃秉宏 (國立臺灣師範大學生命科學系)

