

本文章已註冊DOI數位物件識別碼

▶ 紅檜、台灣扁柏、台灣冷杉、台灣鐵杉和台灣杉caffeoyl CoA 3-O-methyltransferase基因之選殖與序列分析

Gene Cloning and Sequence Analysis of Caffeoyl CoA 3-O-methyltransferase from *Chamaecyparis formosensis* Matsum., *Chamaecyparis obtusa* var. *formosana*, *Abies kawakamii*, *Tsuga chinensis* var. *formosana* an

doi:10.29898/SHBQ.200809.0002

林業研究季刊, 30(3), 2008

Quarterly Journal of Forest Research, 30(3), 2008

作者/Author: 林彥良(Yan-Liang Lin);王升陽(Sheng-Yang Wang);曲芳華(Fang-Hua Chu)

頁數/Page: 13-24

出版日期/Publication Date: 2008/09

引用本篇文獻時，請提供DOI資訊，並透過DOI永久網址取得最正確的書目資訊。

To cite this Article, please include the DOI name in your reference data.

請使用本篇文獻DOI永久網址進行連結:

To link to this Article:

<http://dx.doi.org/10.29898/SHBQ.200809.0002>



DOI Enhanced

DOI是數位物件識別碼（Digital Object Identifier, DOI）的簡稱，是這篇文章在網路上的唯一識別碼，用於永久連結及引用該篇文章。

若想得知更多DOI使用資訊，

請參考 <http://doi.airiti.com>

For more information,

Please see: <http://doi.airiti.com>

請往下捲動至下一頁，開始閱讀本篇文獻

PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE



研究報告

紅檜、台灣扁柏、台灣冷杉、台灣鐵杉和台灣杉 caffeoyl CoA 3-*O*-methyltransferase 基因之 選殖與序列分析

林彥良¹ 王升陽² 曲芳華³

【摘要】木質素為植物體內含量僅次於纖維素之重要成分，於木質素生合成過程中，甲基轉移酵素 (*O*-methyltransferase, OMT) 扮演相當重要的角色。我們自資料庫中收集並分析已發表之草本和木本植物 caffeoyl CoA 3-*O*-methyltransferase (*CCoAOMT*) 序列，在具高保守性的序列中設計了一對引子，並對紅檜、台灣扁柏、台灣冷杉、台灣鐵杉和台灣杉進行 OMT 基因的釣取，同時配合 RACE (Rapid Amplify of cDNA End) 的策略，成功獲得紅檜、台灣扁柏、台灣杉的全長基因及台灣冷杉與台灣鐵杉之部分基因片段。由分析比對的結果顯示，此五種台灣現生的針葉樹不論在 DNA 或者是蛋白質的序列上均具有極高的相似性，此序列資料除了可以提供蛋白質功能區塊的預測，也有助於對本土樹種的親緣關係，分子標記與與生化分類的瞭解。

【關鍵詞】紅檜、台灣扁柏、台灣冷杉、台灣鐵杉、台灣杉、甲基轉移酵素、木質素

Research paper

Gene Cloning and Sequence Analysis of Caffeoyl CoA 3-*O*-methyltransferase from *Chamaecyparis formosensis* Matsum., *Chamaecyparis obtusa* var. *formosana*, *Abies* *kawakamii*, *Tsuga chinensis* var. *formosana* and *Taiwania cryptomerioides* Hayata.

Yan-Liang Lin¹ Sheng-Yang Wang² Fang-Hua Chu³

【Abstract】Lignin is the second most abundant biopolymer, next to cellulose, present in the cell wall of plants. In the stepwise biosynthesis pathway of lignin, *O*-methyltransferase (OMT) plays a key role. To investigate the mechanism of wood formation and lignin biosynthesis, it is important to understand the

1. 國立台灣大學森林環境暨資源學系碩士

Master, School of Forestry and Resource Conservation, National Taiwan University.

2. 國立中興大學森林學系副教授

Associate Professor, School of Forestry, National Chung Hsing University

3. 國立台灣大學森林環境暨資源學系助理教授，通訊作者，台北市大安區羅斯福路四段 1 號

Assistant Professor, School of Forestry and Resource Conservation, National Taiwan University, Corresponding Author.
No.1, Sec. 4, Roosevelt Road, 106 Taipei, Taiwan (R.O.C.)

function and characteristic of OMT. In the present study, a set of primer was designed based on the conserved region of OMT genes from several woody and non-woody plants, to clone the counter part gene by PCR and RACE (Rapid Amplify of cDNA END) from *Chamaecyparis formosensis* Matsum., *Chamaecyparis obtusa* var. *formosana*, *Abies kawakamii*, *Tsuga chinensis* var. *formosana* and *Taiwania cryptomerioides* Hayata. The cloned genes were sequenced and their amino acid sequences predicted. According to the alignment data of nucleotides and amino acids sequences, there is a high similarity among the OMT genes from these five species. Thus, our study not only provides valuable information for predicting the protein functional motifs of OMT but also contributes to our understanding of the molecular marker and phylogenetic relationship among these species.

【Key words】 *Chamaecyparis formosensis* Matsum., *Chamaecyparis obtusa* var. *formosana*, *Abies kawakamii*, *Tsuga chinensis* var. *formosana*, *Taiwania cryptomerioides* Hayata., O-methyltransferase, lignin

一、前言

陸生高等維管束植物，不論是草本、灌木、闊葉樹乃至針葉樹，均由其具輸水的維管束組織以及特化的支持系統，使得植物可以不斷的向上生長，而不致於倒伏 (Raven *et al.*, 1999)，此特性乃要歸功於細胞具有次級生長的能力，使得植物的根、莖、葉和枝條具有足夠的支持強度，挺立於陸生環境。誠如所知，植物細胞會由原本的薄壁細胞經過不斷分化，增加、堆積細胞壁中的物質而形成次生細胞壁 (Secondary cell wall)，在此除了含有更多的纖維素 (Cellulose)、果膠質 (Pectin) 之外，更由於堆積了一種重要的成分 - 木質素 (Lignin)，促使細胞壁木質化後，更有利形成支持性和輸導組織，以保護纖維，使細胞具有更強韌的物理性質與機械強度以抵抗外來的生物性和非生物性因子的危害 (Borejan *et al.*, 2003 ; Raven *et al.*, 1999)。

由於木質素在植物中扮演了重要的角色，使得木質素的研究也從單純研究其化學特性，而逐漸將研究重點轉向其於細胞層級的生理代謝、分子生物學層級的基因調控等研究，除了希望能更瞭解木質素的生合成機制之外，也希望能夠加以減少製漿造紙過程中所帶來的化學污染問題。就結構而言，木質素是以苯基丙烷 (Phenylpropanoid) 為單元，經過三度空間的立

體鍵結所形成的網狀、非結晶的巨分子化合物。就單體結構來看，木質素主要由三種木質醇單體 (Monolignol) 所構成：對-香豆醇 (*p*-Coumaryl alcohol)、針葉醇 (Coniferyl alcohol) 和芥子醇 (Sinapyl alcohol)，而由上述的三個木質醇單體述所聚合的木質素則分別叫做：*p*-Hydroxyphenyl lignin (H lignin)、Guaiacyl lignin (G lignin)、Syringyl lignin (S lignin)，但是隨著物種不同，上述三種化合物的相對含量也不盡相同，但還是可以概括性的歸納出，裸子植物以 G lignin 為主要構成，而被子植物為 G + S lignin，草本植物多 H + G + S lignin (Borejan *et al.*, 2003)。同時，木質素更是僅次於纖維素，為地球上含量第二豐富的自然聚合物。據估算，在生物圈中一年有將近 1.4×10^{12} Kg 的碳被固定在陸地上的植物體內，其中木質素則約佔有 30 % 的有機碳含量，為生物圈主要之碳吸存形態 (Battle *et al.*, 2000 ; Borejan *et al.*, 2003)，其中又以木本植物中的木材形成為最為大宗。以生合成的觀點來看，木質素為植物生長的一個次級代謝物，和整體植物生長發育並沒有直接的關係，但是在植物的支持組織和部分的運輸組織中，木質素的填充對於細胞的次級生長則有不可或缺的功能 (Raven *et al.*, 1999)。

O-methyltransferase 也就是由 OMT 基因

所生成的酵素蛋白，主要的功能在對苯基化合物進行甲基 (methyl group) 的轉移，而針對不同的催化對象有不同的特定酵素，圖 1 為 OMT 相關的重要催化過程，由 Caffeoyl-CoA *O*-methyltransferase (CCoAOMT) 所催化，可將 caffeoyl CoA 催化生成 feruloyl CoA 或是將 5-hydroxyferuloyl CoA 催化生成 sinapoyl CoA；而第二部分的甲基轉移由 Caffeic acid *O*-methyltransferase (COMT) 來負責，caffeic acid 進行催化生成 ferulic acid (3' methylation) 或是將 5-hydroxyferulic acid 催化生成 sinapic acid (5' methylation) (Burlat *et al.*, 2001; Humphreys and Chapple, 2002)。綜合前述，裸子植物的木質素以 G lignin 為主要構成，而被子植物為 G + S，草本植物則多 H + G + S；一般來說，在整體生成途徑中，CCoAOMT 主要催化生成 G lignin，而 COMT 偏向生成 S lignin，因此各個基因的表現程度不同，則會影響木質素的成分。本研究即針對台灣產針葉樹木質素生成相關的 CCoAOMT 來進行基因的釣取與分析，以瞭解樹種間之親緣關係。CCoAOMT 在植物的生長過程中並非一個常駐且大量表現的 House-keeping gene，在 Loblolly pine (*Pinus taeda*) 的染色體中為一個拷貝 (Li *et al.*, 1999)，但在同屬的 Scot pine (*Pinus sylvestris* L.) 中卻高達十二個拷貝數，並推測 CCoAOMT 有一整個 Gene family 的存在 (Chiron *et al.*, 2000)。同樣在染色體中出現五個拷貝數且推測具有一整個 Gene family 的還包括百日草 (Ye *et al.*, 1994)，但基因的拷貝數多寡並不能絕對代表基因的表現量，必須考慮生長發育之情況與不同組織之特異性。

二、材料與方法

(一) 試驗材料

本試驗所採用的材料：紅檜 (*C. formosensis* Matsum.)、台灣扁柏 (*C. obtusa* var. *formosana*) 及台灣杉 (*T. cryptomerioides* Hayata.) 採自國立台灣大學實驗林溪頭營林區，台灣冷杉

(*A. kawakamii*) 及台灣鐵杉 (*T. chinensis* var. *formosana*) 採自合歡山，所採取之樣品葉部以液態氮凍之並儲存於 -80°C 冰箱備用。

(二) 樹皮總量 RNA 抽取與反轉錄反應

將儲存於 -80°C 之材料取出，並在液態氮中磨成細粉狀後，依照 Chang *et al.* (1993) 的方法萃取樹皮中的總 RNA，並將 RNA 利用 SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen) 反轉錄酵素合成單股的 cDNA，再利用 Ex Taq (TaKaRa) 進行 Polymerase chain reaction (PCR) 反應，合成雙股之 dsDNA，作為後續實驗之材料。

(三) CCoAOMT 基因全長序列之釣取

CCoAOMT 基因的釣取須先設計引子進行保守性序列片段的釣取，再往外延伸至頭尾未知的序列，最後將所有的資料整合獲得 OMT 基因的全長序列。

1. 專一性序列之釣取及特定基因之純化、質體建構與基因定序

由 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 基因資料庫中收集多種已發表之草本和木本植物的 CCoAOMT 序列，並在具有高保守性的序列中設計出一對引子，分別命名為：

CCOMT-F : 5' -CA (G/A) AG (T/C) GATGC (T/C) CT (C/T) TA (T/C) CA (G/A) -3'

CCOMT-R : 5' -GG (A/C/T) GC (C/A) AC-CAC (A/G) GA (T/G) CC (A/G) TTCCA-3'

利用此對引子配合核酸增幅器，並利用先前反應所合成的 dsDNA 做為材料，進行 94°C 1 min, (94°C 30 s, X°C 30 s, 72°C 1 min, X 隨著實驗不同進行調整) 以上溫度進行 35 個循環後，72°C 反應 7 min，最後保持在 4°C 結束 PCR 程序。PCR 反應產物經過 1.2% 的洋菜膠電泳，利用 DNA Clean/Extraction Kit (GeneMark) 來進行特定片段大小的序列之分離，並建構至 pGEM-T Easy (Promega) 載體上，轉入 High Efficiency DH5α Competent cell (GeneMark) 中，利用含有 Ampicillin、Isopropyl-

β -D-thiogalactoside (IPTG)及 5-bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-galactoside (X-Gal) 的 LB 固態培養基來進行篩選，並抽取高濃度的質體以提供 ABI 377 自動定序儀 (Perkin Elmer)，利用 T7 或是 SP6 primer 進行基因定序，並得到序列資料。

2. 定序結果之分析

基因定序的結果，利用 ChromasPro 進行初步的分析，扣除質體的序列，即為實驗所要鈎取的特定基因序列，為確保定序資料之正確性，可先至 NCBI 網站進行 Blastx 與 Blastn 的序列比對。

3. *CCoAOMT* 基因之 5' 端與 3' 端序列之鈎取

利用先前實驗所得之保守性序列，設計針對序列 5' 端與 3' 端兩個方向進行 Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) 與 Genome Walking 所需之引子，並依照 BD SMART™ RACE cDNA Amplification Kit 與 BD GenomeWalker™ Universal Kit 之步驟，經過 PCR 反應增幅出特定之序列片段，並選殖到 pGEM-T easy 質體中，加以定序並得到序列資料。

(四) *CCoAOMT* 基因序列之親緣關係比較

從 NCBI 之基因資料庫中收集他種物種之 *CCoAOMT* 基因之相關資訊，並利用國家衛生院所提供的 Genetic Computer Group (GCG) 巨分子序列分析服務，進行序列資料的整合 (Pileup)，再利用 Phylip 3.6 分析軟體進行 Neighbor-joining method 與 bootstrap 的分析，製作親緣關係演化樹狀圖。

三、結果

(一) *CCoAOMT* 基因序列之鈎取

經整理定序結果，在紅檜、台灣扁柏、台灣冷杉、台灣鐵杉和台灣杉中分別得到保守性序列的片段為：526、687、527、527、520 個鹼基對，將此序列資料應用來進行 5' 端的 RACE 與 3' 端的 RACE，唯有紅檜、扁柏和台灣杉可以得到基因之全長，台灣冷杉與台灣鐵

杉只獲得 3' 端 RACE 序列，組合前後序列分別可以得到 1133、1300、953、956、1010 個鹼基對，經過與資料庫的比對選取出負責轉錄蛋白質的 Coding Sequence Region (CDS) 各為 750、837、672、672、750 個鹼基對，並分別預估可以轉錄出 249、278、223、223、249 個氨基酸的蛋白質，經由基因與蛋白質資料庫 (EMBL-EBI) 的資料比對，可以推估本研究所得到的 OMT 蛋白屬於 *O*-methyltransferase family 3，並且具有一個 SAM (S-Adenosyl Methionine) 的 binding motif。

(二) 序列之比較

將五種樹種的部分可轉譯蛋白質區塊資料經由 ClustalW 加以並列分析，結果如表 1、圖 1 與圖 2，序列的比較上，同屬於松科 (*Pinaceae*) 的台灣冷杉與台灣鐵杉為最高：95%，以及台灣杉與紅檜同樣具有 95% 相似度，最低為：台灣杉與台灣冷杉的 75%，另外同屬於柏科 (*Cupressaceae*) 的台灣杉與紅檜為最高：相同度 98%，紅檜與台灣扁柏為次高：94%；在胺基酸序列的相似度上，最低則為台灣冷杉與台灣扁柏的相似度為 82%。

(三) *CCoAOMT* 基因之親緣關係演化樹狀圖

從基因庫中選取 23 種已發表之不同物種 *CCoAOMT* 的基因序列，並經由國家衛生研究院之巨分子序列分析服務 GCG (Genetics Computer Group) 加以 alignment，包括：*Citrus natsudaoidai* (AB035144)、*Solanum tuberosum* (AB061268)、*Codonopsis lanceolata* (AB243012)、*Pinus taeda* (AF036095)、*Eucalyptus gunnii* (AF046122)、*Mesembryanthemum crystallinum* (AF053553)、*Populus alba* x *Populus tremula* (AF327458)、*Populus trichocarpa* (AJ224894)、*Picea abies* (AM262870)、*Zea mays* (AY323269)、*Ammi majus* (AY620645)、*Oryza sativa* (japonica cultivar-group) (AY644636)、*Boehmeria nivea* (AY651026)、*Betula platyphylla* (AY860952)、*Linum usitatissimum* (DQ090002)、*Arabidopsis thaliana* (NM_105468)、*Zinnia elegans* (U13151)、

Medicago sativa (U20736)、*Populus tremuloides* (U27116)、*Eucalyptus citriodora* (Y12228)、*Petroselinum crispum* (Z54183)、*Vitis vinifera* (Z54233)、*Nicotiana tabacum* (U62735)，最後經過軟體 Phylip3.6 之處理得到親緣關係演化樹狀圖如圖 4，圖中虛線圈出不同之本木植物，其餘為草本植物，多數木本植物皆在圖之左方的分支，唯一例外為楊樹被劃分在草本植物中，本實驗所獲得之 *CfCCoAOMT* 與台灣杉親緣關係最近，與火炬松和挪威雲杉同屬一分支。

四、討論

(一) 木質素的重要性

與動物不同，植物並不具有骨骼系統，而是藉由細胞互相堆疊，並特化出具支持與輸水功能之組織而使其能屹立於大地之上。植物細胞較動物細胞多出了獨有之細胞壁的構造，主要是由纖維素、半纖維素、果膠質與木質素而組成，纖維素與半纖維素互相交錯形成所謂之微纖維絲 (Microfibril)，構成細胞壁主要之穩固結構，再由木質素的填充使得細胞壁具有相當的韌性，以獲得強韌的物理性質得以支持整體植株的生長，抵抗外來生物性以及非生物性因子的危害，或對外界病原菌之入侵達到抵禦的作用 (Baucher *et al.*, 1998 ; Borejan *et al.*, 2003 ; Dixon, 2001 ; Hu *et al.*, 1999 ; Vance *et al.*, 1980)。

木質素為植物生長不可或缺的重要成分之一，但站在造漿製紙工業與生物性分解等角度來觀察，木質素並非一個可輕鬆面對的化合物，由於木質素在植物細胞生長時填充於細胞壁中並與纖維素、半纖維素呈 1 : 2 : 1 之比例 (Freudenberg, 1965)，佔木材的乾重 15%-35%，再者木質素以多數苯基丙烷為單體進行三度空間鍵結而形成之網狀巨分子化合物，其化學鍵結不容易被打斷 (Adler, 1977 ; Higuchi, 1990)，進而造成木質素去除與分解之不易，所以許多的研究著重於如何去除植物之木質素，或是改

變木質素之生合成狀況，以降低去除木質素時所耗費之能量減低對環境所造成之衝擊與降低工業生產上之成本 (Campbell and Sederoff, 1996 ; Dean and Eriksson, 1992 ; Hu *et al.*, 1999 ; Lapierre *et al.*, 1999 ; Whetten and Sederoff, 1991)

木質素為植物主要組成成分之一，具有許多功能，舉凡是有利形成支持性和輸導組織、保護纖維、提供更強韌的物理性質、抵抗外來生物性以及非生物性因子的危害之角色抵禦生物性、非生物性的外來傷害…等，均是木質素於植物中所具有之功能。所以就農業的利用而言，木質素則是一個重要的化合物，所以瞭解木質素的生合成途徑，除了可以增加對木質素生成的認識，更可經由瞭解生成途徑來對木質素的生合成加以修飾並控制。而木質素的生成途徑已經被研究有數十幾年了，對於木質素的生成途徑，也由於不同的酵素、化合物和分析技術被提出、改良而不斷的被修正，但整體的合成途徑中仍有很多不確定的部分，直至今日仍然有更多新的關鍵蛋白 (key enzyme) 被發現，甚至是我們尚未發現的新路徑 (Humphreys and Chapple 2002)。

(二) *CCoAOMT* 基因之選殖及特性

本研究從基因資料庫所選取之已知物種的 *CCoAOMT* 基因資料，並加以比對分析，選取一段在 DNA 序列與胺基酸序列皆具有高保守性的區塊，同時設計出一組 Degenerate primer，此組引子對除了可以成功在紅檜釣取出 *CCoAOMT* 的保守性序列，對其他的樹種包括台灣扁柏 (*C. obtusa*)、台灣杉 (*T. cryptomerioides*)、台灣冷杉 (*A. kawakamii*) 與臺灣鐵杉 (*T. chinensis*) 也可以得到相同的結果，再加以利用 3' RACE 的實驗，同樣也可以得到其他樹種之 *CCoAOMT* 基因的 3' 端區域，將序列資料加以整理並利用 ClustalW 的並列比對分析，如表 1 與圖 2，保守性序列的比較上，同屬於松科 (*Pinaceae*) 的台灣冷杉與台灣鐵杉為最高，而台灣冷杉與台灣扁柏最低，另外同

屬於柏科 (*Cupressaceae*) 的紅檜與台灣扁柏為次高；圖 3 為胺基酸序列的並列分析，以不同屬之臺灣杉與紅檜為最高，最低為台灣冷杉與扁柏，兩相比較之結果可以發現，雖然在 DNA 序列上稍有差距，但是在蛋白質的胺基酸序列上相似度卻仍是很高，此乃因為所產生之蛋白質在 3-D 立體結構中負責進行催化的核心部位非常相類似，此核心之活性在於金屬離子之偶合作用，與不同的二價金屬離子結合而具有催化之活性，就算是不同物種之 *CCoAOMT* 或是不同種類的 *OMT*，只要在立體結構的核心部位具有相類似之構造與 SAM binding motif 則可負擔起甲基轉移之功效 (Ferrer *et al.*, 2005, Ibdah *et al.*, 2003)。

在國內，林等人 (1999) 也曾將顫楊 (*Populus tremuloides*; Aspen) 的 *OMT* 基因轉殖到甜楓 (*Liquidambar styraciflua*) 中，雖然利用反義股的策略未達到降低木質素的作用，但此結果也顯示了 *OMT* 基因的高度專一性。然而藉由正股的策略而轉殖獲得的苗木，可達到促進苗木生長與生理性狀之效應，顯示在對 *OMT* 基因調控上，不只可利用去除木質素，也可增加 *OMT* 基因的表現以提升整體植株的生長能力。由此可知，在木質素的整體生合成途徑是非常複雜的，未來也希望能有更進一步的研究，可以全面性的瞭解基因之間的交互作用及調控機制，可進一步瞭解其整個生合成之機制。

五、誌謝

本文承蒙行政院國家科學委員會提供研究經費，以及台灣大學實驗林管理處提供實驗材料；在此致上十二萬分的謝意。

六、參考文獻

林巖、郭幸榮、陳振榮 (1999) 外源甲基轉移酶核酸之表現對甜楓苗木生長及生理性狀之影響。台灣林業科學 14(1) : 77-86。

Battle M., M. L. Bender, P. P. Tans, J. W. White, J. T. Ellis, T. Conway and R. J. Francey

(2000) Global carbon sinks and their variability inferred from atmospheric O₂ and δ¹³C. *Science* 287: 2467-2470

Boerjan W., J. Ralph and M. Baucher (2003) Lignin biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology* 54: 519-546

Burlat V., M. Kwon, L. B. Davin and N. G. Lewis (2001) Dirigent proteins and dirigent sites in lignifying tissues. *Phytochemistry* 57: 883-897

Chang, S., J. puryear, J. Cairney (1993) A simple and efficient method for isolation RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter* 11: 113-116

Chiron, H., A. Drouet, A-C. Claudot, C. Eckerskorn, M. Trost, W. Heller, D. Ernst and H. Sandermann Jr (2000) Molecular cloning and functional expression of a stress-induced multifunctional *O*-methyltransferase with pinosylvin methyltransferase activity from Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Plant Molecular Biology* 44:733-745

Humphreys J. M. and C. Chapple (2002) Rewriting the lignin roadmap. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 224-229

Li, L., Y. Osakabe, C. P. Joshi and V. L. Chiang (1999) Secondary xylem-specific expression of caffeoyl-coenzyme A 3-*O*-methyltransferase plays an important role in the methylation pathway associated with lignin biosynthesis in loblolly pine. *Plant Molecular Biology* 40(4) : 555-565.

Pincon, G., S. Maury, L. Hoffmann, P. Geoffroy, C. Lapierre, B. Pollet and M. Legrand (2001) Repression of *O*-methyltransferase genes in transgenic tobacco affects lignin synthesis and plant growth. *Phytochemistry* 57: 1167-1176

Raven P. H., R. F. Evert and S. E. Eichhorn (1999) *Biology of Plants*. Sixth edition. W.

H. Freeman and Company/Worth Publishers:
554-670
Ye, Z. H., R. E. Kneusel, U. Matern and J. E.

Varner (1994) An alternative methylation
pathway in lignin biosynthesis in *Zinnia*.
Plant Cell 6: 1427-1439.

表 1. 台灣扁柏、紅檜、台灣杉、台灣冷杉與台灣鐵杉之 *CCoAOMT* 基因，保守性序列與 3' 端非轉譯區之相似度及胺基酸序列之相似度。

Table 1. *CCoAOMT* gene's nucleotide identity and amino acid sequence's identity between *C. obtusa* var *formosana*, *C. formosensis* Matsum., *T. cryptomerioides* Hayata., *A. kawakamii* and *T. chinensis* var. *formosana*.

aa identity (positive)	Nt identity				
	AK	TSC	CO	CF	TC
AK		95 %	77 %	77 %	75 %
TSC	95 % (97 %)		78 %	78 %	77 %
CO	82 % (90 %)	83 % (91 %)		94 %	92 %
CF	84 % (92 %)	84 % (91 %)	97 % (98 %)		95 %
TC	82 % (91 %)	83 % (91 %)	96 % (98 %)	98 (99 %)	

註：AK : *A.kawakamii*、TSC : *T.chinensis* var *formosana*、CO : *C.obtusa* var. *formosana*、CF : *C.formosensis* Matsum.、TC : *T.cryptomerioides* Hayata.、Nt : nucleotide、aa : amino acid



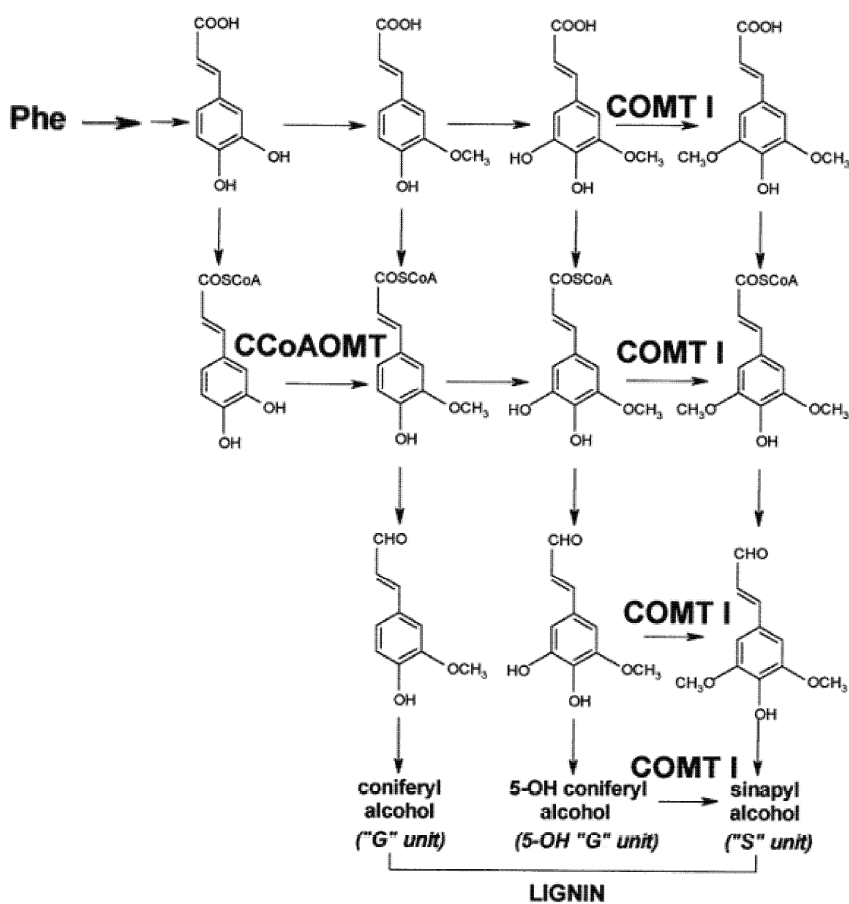


圖 1. 木質素生成的化學合成路徑簡圖 (Pincon *et al.*, 2001)

Fig. 1. Biosynthesis pathway of lignin. (Pincon *et al.*, 2001)

<i>C. formosensis</i>	ATGGCAACCGTAGAGGCTACCAAGGATTCAACACAGCAGGTGAGCCGCCACCAGGAGGTG	60
<i>T. cryptomerioides</i>	ATGGCAACCGTAGAGGCTACCAAGGATTCAACACAGCAAGTGAGCCGACACCAGGAGGTG	60
<i>C. obtusa</i>	ATGGCAACCGTAGAGGCTACCAAGGATTCAACACAGCAAGTGAGCCGACACCAGGAGGTG	60
<i>A. kawakamii</i>	-----	
<i>T. chinensis</i>	-----	
<i>C. formosensis</i>	GGCCACAAGAGTCTCCTTCAGAGCGATGCTCTCTATCAGTATATATTGGAACACAGTGTG	120
<i>T. cryptomerioides</i>	GGACACAAGAGTCTCCTGCAGAGCGATGCTCTCTATCAGTATATATTGGAGACCAGCGTG	120
<i>C. obtusa</i>	GGACACAAGAGTCTCCTGCAGAGCGATGCTCTCTATCAGTATATATTGGAGACCAGCGTG	120
<i>A. kawakamii</i>	-----CAGAGTGATGCCCTTTACCAGTATATATTGGAACACAGTGTG	42
<i>T. chinensis</i>	-----CAAAGTGATGCTCTTTATCAGTATATATTGGAACAAGCGTG	42
	** ** * * * * *	
<i>C. formosensis</i>	TATCCCGCGAGCCTGAACCAATGAGGGAGCTCAGAGAAATAACT-----	165
<i>T. cryptomerioides</i>	TATCCCGCGAGCCTGAGTCAATGAGGGAACCTCAGAGAAATAACT-----	165
<i>C. obtusa</i>	TATCCCGCGAGCCTGAGTCAATGAGGGAGCTCAGAGAAATAACCCAGAGTGATGCTCTT	180
<i>A. kawakamii</i>	TACCCTCGTGAGCCCGAGCCATTGAAGGAGCTCCGGGAAGTGACT-----	87
<i>T. chinensis</i>	TACCCTCGTGAGCCCGAGTCAATGAAGGAGCTCCGGGAAGTGACT-----	87
	** ** * * * * *	
<i>C. formosensis</i>	-----	
<i>T. cryptomerioides</i>	-----	
<i>C. obtusa</i>	TACCAGTATATATTGGAACAAGTGATATCCCGCGAGCCTGAGTCAATGAGGGAGCTC	240
<i>A. kawakamii</i>	-----	
<i>T. chinensis</i>	-----	
<i>C. formosensis</i>	-----GCTAAGCATCCATGGAATTTGATGACTACTTCGGCTGATGAGGGCCAA	213
<i>T. cryptomerioides</i>	-----GCTAAGCATCCATGGAATTTGATGACTACTTCGGCTGATGAGGGCCAA	213
<i>C. obtusa</i>	AGAGAAATAACCGCCAAGCATCCATGGAATCTGATGACTACTTCGGCTGATGAGGGTCAG	300
<i>A. kawakamii</i>	-----GCCAAACATCCCTGGAACCTCATGACTACTTCTGCCGACGAGGGTCAA	135
<i>T. chinensis</i>	-----GCCAAACATCCCTGGAACCTCATGACTACTTCTGCCGATGAGGGTCAA	135
	** ** * * * * *	
<i>C. formosensis</i>	TTTTTACATCTTTTGTTGAAGCTCATCAATGCCAAGAACACCATGGAGATTGGTGTGTAT	273
<i>T. cryptomerioides</i>	TTTTTACATCTTTTGTTGAAGCTCATCAATGCCAAGAACACCATGGAGATTGGTGTGTAT	273
<i>C. obtusa</i>	TTTTTAAACCTTTTGTTGAAGCTCATTAAATGCCAAGAACACCATGGAGATTGGTGTGTAT	360
<i>A. kawakamii</i>	TTCTGGGCCTCCTGCTGAAGCTCATTAAACGCCAAGAACACGATGGAGATCGGGGTGTAC	195
<i>T. chinensis</i>	TTCTGGGCCTCCTGCTGAAGCTCTTTAAACGCCAAGAACACTATGGAGATTGGAGTGTAC	195
	** * * * * *	
<i>C. formosensis</i>	ACTGGTTATTCGCTTCTCAGCACTGCTCTTGCCCTACCTGATGATGGCAAGATTTAGCA	333
<i>T. cryptomerioides</i>	ACTGGTTATTCGCTTCTCAGCACTGCTCTTGCCCTACCTGATGATGGCAAGATTTAGCA	333
<i>C. obtusa</i>	ACTGGTTATTCACCTTCTCAGCACTGCTCTTGCCCTACCTGATGATGGCAAGATTTAGCA	420
<i>A. kawakamii</i>	ACCGGTTACTCGCTTCTCAGCACAGCACTTGCAATTGCCGATGATGGAAAGATTCTAGCC	255
<i>T. chinensis</i>	ACCGGTTACTCGCTTCTCAGCACAGCCCTTGCAATTGCCGATGATGGAAAGATTCTAGCC	255
	** * * * * *	

圖 2. 台灣扁柏、紅檜、台灣杉、台灣冷杉與台灣鐵杉之 *CCoAOMT* 基因，保守性序列並列分析結果，*號代表相同點

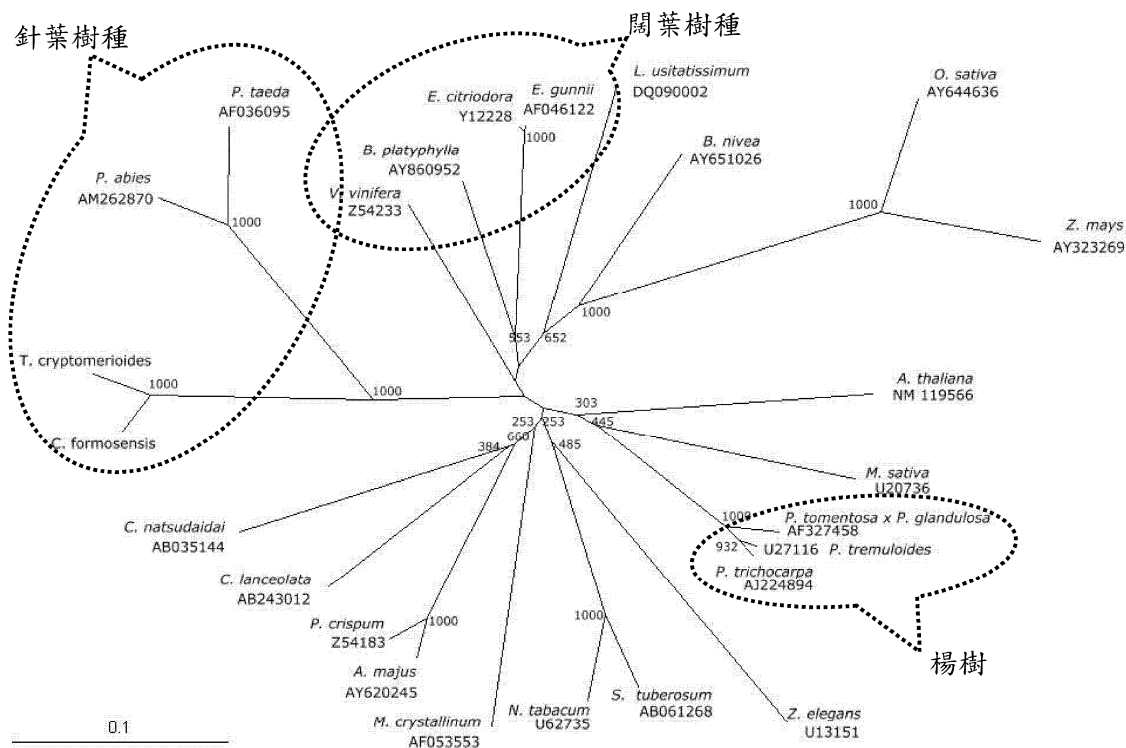
Fig. 2. Alignment of *CCoAOMT* gene's conserved region between *C. obtusa* var. *formosana*, *C. formosensis* Matsum., *T. cryptomerioides* Hayata., *A. kawakamii* and *T. chinensis* Hayata.
* indicates the conserved nucleotide.

<i>C. formosensis</i>	ATGGACATAAACAGGGAGAACTATGAGTTGGGGTTGCCAGTAATTCAAAAAGCAGGGGTT 393
<i>T. cryptomerioides</i>	ATGGACATAAACAGGGAGAACTACGAGCTAGGGTTGCCTGTAATTCAAAAAGCAGGGGTT 393
<i>C. obtusa</i>	ATGGACATAAACAGGGAGAACTATGAGCTAGGGTTGCCTGTAATTCAAAAAGCAGGGGTT 480
<i>A. kawakamii</i>	ATGGACATCAACAGAGAGAACTATGATTGGGGCTGCCTATGATTAGAAAGCAGGAGTT 315
<i>T. chinensis</i>	ATGGACATTAACAGGGAGAACTATGATCTGGGGCTGCCTATTATTAGAAAGCAGGAGTT 315
	***** **** * ***** ** * *** **** * *** * ***** ***
<i>C. formosensis</i>	GCCACAAAATTGACTTCAGAGAGGGCCCTGCTCTACCAGTTCTTGATCAAAATGCTGGAA 453
<i>T. cryptomerioides</i>	GCCACAAAATTGACTTCAGAGAGGGCCCTGCTCTACCAGTTCTTGATCAAAATGCTGGAA 453
<i>C. obtusa</i>	GCCACAAAATTGACTTCAGAGAGGGCCCTGCTCTACCAGTTCTTGATCAAAATGCTGGAA 540
<i>A. kawakamii</i>	GCCACAAGATCGACTTCAGGGAGGGCCCTGCTCTCTCTCTTGACGAAATGCTTATG 375
<i>T. chinensis</i>	GCCACAAGATCGACTTCAGGGAGGGCCCTGCTCTGCCACTCTTGACGAAATGGTTAAG 375
	***** ** ***** ***** * ** **** * ***** *
<i>C. formosensis</i>	AATAAGGAAATGCATGGTTCCTTCGATTTCATATTCGTGGACGCAGACAAAGACAATTAT 513
<i>T. cryptomerioides</i>	AATAAGGAAATGCATGGTTCCTTCGATTTCATATTCGTGGACGCAGACAAAGACAATTAT 513
<i>C. obtusa</i>	AATAAGGAAATGCATGGTTCCTTCGATTTCATATTCGTGGACGCAGACAAAGACAATTAT 600
<i>A. kawakamii</i>	AATGAGGACTTGATGGATCGTTCGACTTTGTGTTGTGGATGCCGACAAAGACAATTAT 435
<i>T. chinensis</i>	AATGAGGAGTTGATGGATCGTTCGACTTTGTGTTGTGGACGCCGACAAAGACAATTAT 435
	*** **** ***** ** ***** * * ** ***** ** ***** * ***
<i>C. formosensis</i>	CTGAATTACCACAAGCGGCTGATTGATCTGGTGAAGATTGGGGAGTGATCGGGTACGAC 573
<i>T. cryptomerioides</i>	CTGAATTACCACAAGCGGCTGATTGATCTGGTGAAGATTGGGGGGTTATCGGCTACGAC 573
<i>C. obtusa</i>	CTGAATTACCACAAGCGGCTGATTGATCTGGTGAAGATTGGGGAGTAATCGGGTACGAC 660
<i>A. kawakamii</i>	CTAAACTACCACAAGCGTCTGATCGATCTGGTGAAGGTTGGAGGAGTGATTGCCTATGAT 495
<i>T. chinensis</i>	CTAAACTACCACAAGCGTCTGATCGATCTGGTGAAGGTTGGAGGAGTGATTGCCTATGAT 495
	** * ***** ***** ***** **** * * * * *
<i>C. formosensis</i>	AATACTCTGTGGAATGGATCAGTGGTGGCTCCACCCGATGCCCAATGAGGAAATATGTG 633
<i>T. cryptomerioides</i>	AACNCTCTGTGGAACGGATCAGTGGTGGCTCCACCCGATGCCCGCTAAGGAAATATGTG 633
<i>C. obtusa</i>	AATACTCTGTGGAATGGATCAGTGGTGGCTCCACCCGATGCCCAATGAGGAAATATGTG 720
<i>A. kawakamii</i>	AATACTCTGTGGCTAGGATCCGTTGCGATTCCCCACGATGCTCCCATGAGCGTAATCATG 555
<i>T. chinensis</i>	AATACTCTGTGGCTAGGATCCGTTGCGATTCCCCACGATGCTCCCATGAGCGTAATCATG 555
	** ***** ***** ** * * *** * ***** ** * * * *
<i>C. formosensis</i>	AGATATTACAGAGACTTTGTGATTGAACTGAACAAGGCCCTCGCTGCAGACCCCTCGTATT 693
<i>T. cryptomerioides</i>	AGATATTACAGAGACTTTGTAATTGAACTGAACAAGGCCCTCGCTGCAGACCCACGTATT 693
<i>C. obtusa</i>	AGATATTACAGAGACTTTGTAATTGAACTGAACAAGGCCCTCGCTGCAGACCCCTCGTATT 780
<i>A. kawakamii</i>	AGATGTGAGAGAGATTGCACGGTTGAACTGAATAAGACCCTCGCAGCAGACCCCTCGTATC 615
<i>T. chinensis</i>	AGATGTGAGAGAGATTGCACGGTTGAACTGAATAAGACCCTCACAGCAGACCCCTCGTATC 615
	**** * * ***** * ***** **** ***** * ***** *****
<i>C. formosensis</i>	GAAATCAGCCAAATTCCTGTAGGAGATGGCATCACTCTCTGCAGAAGAATTATTTGA 750
<i>T. cryptomerioides</i>	GAAATCAGCCAAATTCAGTCGGAGATGGCATCACCTCTGCAGGAGGATTTCTTAA 750
<i>C. obtusa</i>	GAAATCAGCCAAATTCAGTAGGAGATGGTATCACTCTCTGCAGACGAGTTATTTGA 837
<i>A. kawakamii</i>	GAGATTCCCAAATCCCAATCGCCGATGGAGTCACGCCGTGCAGGCGCATTTTCTGA 672
<i>T. chinensis</i>	GAGATTCCCAAATCCCAATCGCCGATGGAGTCACGCTGTGCAGGCGCATTTTCTGA 672
	** ** ***** ** * * ***** **** * ***** * * * *

圖 2. (續) 台灣扁柏、紅檜、台灣杉、台灣冷杉與台灣鐵杉之 *CCoAOMT* 基因，保守性序列並列分析結果，*號代表相同點

Fig. 2. (continued) Alignment of *CCoAOMT* gene's conserved region between *C. obtusa* var. *formosana*, *C. formosensis* Matsum., *T. cryptomerioides* Hayata., *A. kawakamii* and *T. chinensis* Hayata. * indicates the conserved nucleotide.

Fig. 3. Alignment partial amino acid sequence of *CCoAOMT* between *C. obtusa* var. *formosana*, *C. formosensis* Matsum., *T. cryptomerioides* Hayata., *A. kawakamii* and *T. chinensis* var. *formosana*.

圖 4. *CCoAOMT* 基因之親緣關係演化樹狀圖Fig. 4. Phylogenetic tree of *CCoAOMT* gene coding sequences from various species.