

Phylogenetic Relationships of Plants Belonging to the Genus *Aristolochia*
(Aristolochiaceae) of Taiwan Based on Nuclear Internal Transcribed
Spacer Sequences

以核內的內轉錄區間序列探討台灣馬兜鈴屬之親緣關係

Szu-Lin Huang, Mei-Chen Tseng, Jieh-Horng Hwang and Che-Feng Lu

黃思霖 曾美珍 黃介宏 呂車鳳

ENDEMIC SPECIES RESEARCH

Vol. 9, No. 2

July 2007

特有生物研究

第九卷第二期

中華民國九十六年七月

Published by Endemic Species Research Institute, Council of Agriculture
Jiji, Nantou, Taiwan, ROC

行政院農業委員會特有生物研究保育中心 編印
南投、集集



以核內的內轉錄區間序列探討台灣馬兜鈴屬之親緣關係
Phylogenetic Relationships of Plants Belonging to the Genus
Aristolochia (Aristolochiaceae) of Taiwan Based on
Nuclear Internal Transcribed Spacer Sequences

黃思霖¹ 曾美珍^{2,*} 黃介宏¹ 呂車鳳¹

Szu-Lin Huang¹, Mei-Chen Tseng^{2,*}, Jieh-Horng Hwang¹ and Che-Feng Lu¹

¹ 大仁科技大學製藥科技研究所 屏東縣鹽埔鄉新二村維新路 20 號

² 國立屏東科技大學水產養殖系 屏東縣內埔鄉學府路 1 號

¹ The Graduate Institute of Pharmaceutical Technology, Tajen University of Science
and Technology, Pingtung, Taiwan

² Department of Aquaculture, National Pingtung University of Science and
Technology, Pingtung, Taiwan

* 通訊作者

* Corresponding author

摘 要

馬兜鈴屬 (*Aristolochia*) 隸屬於馬兜鈴科，是重要的傳統中藥。已知台灣地區分布 6 種馬兜鈴屬植物包括瓜葉馬兜鈴 (*Aristolochia cucurbitifolia*)、異葉馬兜鈴 (*A. heterophylla*)、大葉馬兜鈴 (*A. kaempferi*)、港口馬兜鈴 (*A. zollingeriana*)、蜂窩馬兜鈴 (*A. foveolata*) 和台灣馬兜鈴 (*A. shimadai*)。近 10 年來，植物系統分類學者利用形態特徵、化學組成和核型來建構本屬內種間之分類地位，然而其結果存在一些爭議。本研究以細胞核內轉錄區間(internal transcribed spacer, ITS)序列作為分子遺傳標誌，分析 6 種馬兜鈴植物 ITS 序列之間的遺傳差異並重建種間之親緣關係。結果顯示本屬植物之內轉錄區間序列總長度介於 661 bp (港口馬兜鈴) -690 bp (台灣馬兜鈴)，全段序列 G + C 鹼基組成約 63.7%。港口馬兜鈴與異葉馬兜鈴間的遺傳距離最高，為 0.609；大葉馬兜鈴與台灣馬兜鈴間最近緣，遺傳距離為 0.007。以聚類分析法建構之親緣樹狀圖，台灣的馬兜鈴可區

分爲兩大群，第一群包括港口馬兜鈴和蜂窩馬兜鈴，其餘 4 種則形成另一系群。

Abstract

Plants of the genus *Aristolochia* (Aristolochiaceae) are important Chinese traditional herb-medicines. There are six species that have been described from Taiwan: *Aristolochia cucurbitifolia*, *A. heterophylla*, *A. kaempferi*, *A. zollingeriana*, *A. foveolata* and *A. shimadai*. Their taxonomic status and systematic relationships have been analyzed in the last decade by means of their karyotypes, morphological characters and chemical constituents, but controversies still remained. We analyzed sequence differences in the internal transcribed spacers (ITS) of the six species, and reconstructed their phylogenetic relationships. The ITS sequences varied in lengths between 661 bp for *A. zollingeriana* and 690 bp for *A. shimadai*, while their G+C contents occupied approximately 63.7%. Genetic distances ranged 0.007 between *A. kaempferi* and *A. shimadai*, and 0.609 between *A. zollingeriana* and *A. heterophylla*. The phylogenetic tree reconstructed with the neighbor-joining method revealed that Taiwan's *Aristolochia* is divided into two groups: *A. zollingeriana* and *A. foveolata* as a group (clade) and *A. cucurbitifolia*, *A. heterophylla*, *A. kaempferi* and *A. shimadai* as another group (clade).

關鍵詞：馬兜鈴屬、內轉錄區間、親緣關係

Key words: *Aristolochia*, internal transcribed spacer (ITS), phylogeny

收件日期：96 年 1 月 15 日

接受日期：96 年 5 月 1 日

Received: January 15, 2007

Accepted: May 1, 2007

緒 言

台灣地區位處亞熱帶，海拔差距大，氣候特徵多樣化，故生物相相當豐富且茂盛，蝴蝶王國的美名享譽國際。棲息在本島東南部中低海拔山區的珠光鳳蝶 *Troides magellanus* (C. & R. Felder)、黃裳鳳蝶 *Troides aeacus kaguya* (Nakahara & Esaki) 和曙鳳蝶 *Atrophanera horishana* (Matsumura)，牠們的幼蟲主要攝食馬兜鈴屬(*Aristolochia*)植物。由於自然棲地受

到人爲干擾及破壞，港口馬兜鈴 (*Aristolochia zollingeriana* Miq.) 和瓜葉馬兜鈴 (*A. cucurbitifolia* Hayata)，依世界自然保育聯盟之標準評估爲需要保育的物種 (呂及郭 1997；呂等 1998；賴 1991)。

馬兜鈴屬植物除了是鳳蝶幼蟲主要的食物外，也是重要的中藥材。中藥材馬兜鈴爲乾燥之成熟果實，具有清降肺氣、止咳平喘良效；青木香用部是乾燥根，具有行氣止痛、解毒消腫的功效；天仙藤用部是乾燥莖葉，用於脘腹

刺痛、關節痺痛、妊娠水腫。馬兜鈴屬植物在世界上約有 300 種，主要分布於熱帶與亞熱帶，少數在溫帶 (朝日百科 1978)；其中瓜葉馬兜鈴為台灣特有種 (彭等 1993)。

本屬植物在台灣地區的調查與研究，1858 年 Miquel 發表之港口馬兜鈴並非根據台灣採集的標本，在台灣最早是 1931 年 Sasaki 於屏東縣鵝鑾鼻附近所採集，發表了 *A. kankauensis* Sasaki，此學名後來經過研究認為與 Miquel 發表之 *A. zollingeriana* 同物異名，才依優先權予以合併。瓜葉馬兜鈴在台灣最早是 1915 年 Hayata 發表，然在 1896 年英人 Augustine Henry 於打狗 (Takow)，即今日高雄地區已有採集紀錄，之後陸續有新的採集地點發表 (吳 2006)。1954 年 Masamune 提出的 *A. mollis* Dunn，此學名後來經過研究認為與 1916 年 Hayata 發表之台灣馬兜鈴 (*A. shimadai* Hayata) 同物異名，依優先權予以合併；在第二版台灣植物誌 (Hou 1996) 中，將台灣馬兜鈴併入到異葉馬兜鈴 (*A. heterophylla* Hemsl.)，歸屬為同一物種 (Hou 1996)。在台灣高氏馬兜鈴 (*A. kaoi* Liu & Lai) 發表在第一版台灣植物誌中 (Liu and Lai 1976)，此學名後來經過研究認為與 1918 年 Merrill 在菲律賓採集發表之蜂窩馬兜鈴 (*A. foveolata* Merr.) 為同物異名，依優先權予以合併。1951 年 Hatusima 採集之 *A. liukuensis* Hatusima 經過後來研究認為與 1805 年 Willd. 發表之大葉馬兜鈴 (*A. kaempferi* Willd.) 為同物異名，依優先權予以合併。

目前本屬植物最主要的化學標誌是萜類 (terpenoids) 和馬兜鈴酸衍生物 (aristolochic acid derivatives)，吳天賞、林昭庚 (2005) 利用化學分類的方法將馬兜鈴屬植物進一步分為 3 個亞屬，第一個 *Pararistolochia* 亞屬富含二萜類 (diterpenoids) 與木質素 (lignans)，但馬兜鈴酸 (aristolochic acid) 和馬兜鈴內醯胺衍生物 (aristolactams) 的含量相對上就較少，例如香港馬兜鈴 (*A. westlandii*) 和彩花馬兜鈴 (*A. elegans*

Masters)。第二個 *Siphisia* 亞屬含有倍半萜 (sesquiterpenoids) 與多量的馬兜鈴酸和馬兜鈴內醯胺衍生物，例如瓜葉馬兜鈴、大葉馬兜鈴、異葉馬兜鈴和綿毛馬兜鈴 (*A. mollissima*)。最後一個 *Aristolochia* 亞屬沒有分離到任何倍半萜類，但是含有大量的馬兜鈴酸和馬兜鈴內醯胺衍生物，例如蜂窩馬兜鈴、港口馬兜鈴和北馬兜鈴 (*A. contorta*)。

Sugawara and Murata (1992) 研究東亞地區 8 種馬兜鈴的細胞染色體，其中瓜葉馬兜鈴、大葉馬兜鈴、琉球馬兜鈴、台灣馬兜鈴、華北馬兜鈴 (*A. onoei*)、東北馬兜鈴 (*A. manshuriensis*) 和香港馬兜鈴染色體數目為 $2n=32$ ；南馬兜鈴 (*A. debilis*) 染色體數目為 $2n=14$ 。Sugawara *et al.* (2001) 利用染色體數目的差異將原來的馬兜鈴屬細分為 2 個亞屬，染色體數目 $2n=32$ 者，屬於 *Siphisia* 亞屬，而染色體數目是 $2n=12$ ， $2n=14$ 或 $2n=16$ 者，分類歸於 *Aristolochia* 亞屬。據此，台灣的種類中，瓜葉馬兜鈴、大葉馬兜鈴和台灣馬兜鈴為 *Siphisia* 亞屬成員，而港口馬兜鈴、蜂窩馬兜鈴和異葉馬兜鈴核型未有相關研究。

早期，植物之分類依植株外觀或花粉粒形態作為區分，經常未能表達遺傳的真正涵義。因此，近年來利用核型和分子遺傳標誌來驗證形態鑑定的正確性；而 Murata *et al.* (2001) 利用 *matK* 的序列，Watanabe *et al.* (2006) 增加 *atpB-rbcL* 與 *trnS-trnG* 的內轉錄區間 (internal transcribed spacer, ITS) 序列，探討馬兜鈴 *Siphisia* 亞屬的系統分類研究。在細胞核內的核糖體 RNA 基因中，內轉錄區間序列的演化速度較快，序列的長度及序列組成也有很大變異，常被用來解決屬內種間的分類問題 (White *et al.* 1990; Rauscher 2002; Lee *et al.* 2002)。本研究擬以細胞核內 18S、5.8S 和 26S rRNA 內轉錄區間序列作為遺傳標誌，探討台灣地區馬兜鈴屬植物的親緣關係。

材料與方法

本研究自台灣地區採集 6 種馬兜鈴屬植物，詳細採集點和經緯度記載於表 1，分別為瓜葉馬兜鈴、異葉馬兜鈴、大葉馬兜鈴、港口

馬兜鈴、蜂窩馬兜鈴和台灣馬兜鈴。採集到的新鮮葉片組織樣本，帶回實驗室，所有樣品採得後以乾燥劑去除水分，置於-70°C 冰箱保存，直到 DNA 的萃取。

表 1. 馬兜鈴屬植物採集地點

Table 1. Sampling locations of the *Aristolochia* plants

Species	Locations	Longitudes and Latitudes	Elevation (m)
<i>Aristolochia cucurbitifolia</i> Hayata	Tainan Hsien, Sinhua Zhen, Chung-Hsing University- Sinhua Forest Station	120°21'27"E 23°01'38"N	300
		121°02'20"E 24°44'40"N	150
<i>Aristolochia heterophylla</i> Hemsl.	Hsingchu Hsien, Zhudong Zhen, Paoshan reservoir	121°10'37"E 24°06'07"N	2,200
<i>Aristolochia kaempferi</i> Willd.	Nantou Hsien, Jenai Shiang, Meifeng-Tsuefeng	120°32'41"E 22°43'34"N	50
<i>Aristolochia zollingeriana</i> Miq.	Pingtung Hsien, Yanpu Shiang, Tajen University	120°47'30"E 22°13'10"N	50-250
<i>Aristolochia foveolata</i> Merr.	Pingtung Hsien, Shihtzu Shiang, Shuangliu Forest Recreation Area	120°21'27"E 23°01'38"N	300
<i>Aristolochia shimadai</i> Hayata	Tainan Hsien, Sinhua Zhen, Chung-Hsing University- Sinhua Forest Station		

萃取馬兜鈴植物葉片的基因組 DNA 主要參考 Doyle and Doyle (1987) 之方法。本實驗參考菊科植物 *Stephanomeria* 屬與 *Espeletia* 屬之 18S rDNA 的 3' 端與 26S rDNA 的 5' 端的序列保留區，分別設計長度 23 核苷酸 IT1 (5'-GTCCA-CTGAACCTTATCATTTAG-3') 與 20 核苷酸之引子 IT4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (Rauscher 2002; Lee *et al.* 2002)。聚合酶鏈鎖反應 (PCR) 熱循環的條件設定為：94°C 完全變性 4 min，放在冰上 10 min，加入聚合酶，94°C 變性 20 sec、54°C 黏合 35 sec、72°C 進行延伸反應 45 sec，重複 42 個循環，最後 72°C 使進行完全的延伸聚合 10 min，25°C、10 min 後拿出 PCR 反應溶液。

以 1% 瓊脂凝膠，內含溴化乙啶螢光染劑

(ethidium bromide, 0.5 mg/ml)，取 5 µl PCR 反應溶液加上 1 µl 6 倍的染色溶液 (6x loading dye)，進行電泳分析，確定產物大小。再使用 Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid®) 純化 PCR 產物。在 0.5 ml 微量離心管內加入 3 µl 純化的片段、1 µl 選殖載體 pGEM-T Easy Vector (Promega®)、5 µl 2X 緩衝溶液、1 µl T4 DNA 接合酶 (ligase) 並以滅菌水補足至 10 µl，混合後放置於 4°C 冰箱進行接合作用 (ligation) 反應到隔夜。取 2 µl 接合產物與 20 µl *E. coli* JM109 勝任細胞混合，進行轉形作用，再取出適量菌液平鋪於具 ampicillin 的選擇性平板培養基，於 37°C 培養到隔夜。選擇單一菌株純化質體 DNA，以全自動高輸出核酸分析儀 (ABI PRISM 3730 DNA Sequencer) 進行定序。

馬兜鈴屬植物 rDNA 之 ITS 序列在 NCBI 基因資料庫中未有 ITS1、5.8S rDNA 和 ITS2 區域之序列被發表，因此選用同科之物種，細辛屬中的細辛 (*Asarum heterotropoides*) 與寒葵 (*Asarum nipponicum*)，當作外群進行分析。所有核酸序列經由 BioEdit 軟體 7.0.5.3 版 Clustal W (Hall 1999) 進行排序，並經由人工校正，再使用軟體 MEGA 3.0 版 (Kumar and Nei 2004) 套裝軟體，以 Maximum parsimony method (Fitch 1971) 分析 DNA 序列鹼基的組成，比較彼此間鹼基對替換 (transition) 及鹼基對顛換 (transversion) 發生的頻率與比值；序列若是鹼基組成比例不平均以及替換與顛換取代頻率不相等，可以選擇使用 Tamura and Nei (TN93) (Kumar *et al.* 2001) 模式的觀點建構遺傳距離，依據 3 種不同的鹼基取代方式 (purine-purine, pyrimidine-pyrimidine, purine-pyrimidine) 以計算遺傳距離。親緣樹狀圖則以 distance matrix，假設演化速率不一的聚類分析法 (neighbor-joining method) 原理 (Saitou 1987)，構築出馬兜鈴屬內親緣關係圖，樹狀圖中每一個分支之可信度利用重複 1,000 次的 bootstrap test (Felsenstein 1985) 分析檢測。

結 果

本實驗使用引子 IT1 和 IT4 進行 PCR 後，複製出細胞核內 18S、5.8S 和 26S rRNA 內轉錄區間 (ITS) 序列，經選殖後，進行 PCR 及電泳檢測其放大序列長度約 900 bp，再進行定序。序列扣除掉載體部分、18S rDNA 及 26S rDNA 片段，剩下內轉錄區間序列約 840 bp，包括 ITS1 區、5.8S rDNA 區和 ITS2 區。內轉錄區間序列總長度介於 638-690 bp，其中 ITS1 區長度介於 253-293 bp、ITS2 區介於 221-253 bp、5.8S rDNA 區則介於 161-164 bp 之間。序列最長的為台灣馬兜鈴 (690 bp)，最短為港口馬兜鈴 (661 bp)，外群細辛為 638 bp，寒葵為 642 bp。分析序列中 4 種鹼基比例，在全段的內轉錄區間序列，其鹼基比例有明顯呈現不平均的現象，平均的 A, T, C, G 組成比分別為 18.7%、17.6%、32.5%、31.2%，G+C 百分比高達 63.7% (表 2)，經分析 5.8S rDNA 基因的 G+C 百分比介於 49.1-56.7%；ITS1 及 ITS2 區域之 G+C 百分比差異更大，G+C 百分比分別介於 64.8-78.2% 及 66.0-81.7% 之間。

表 2. rDNA 分離和合併位置之統計

Table 2. Descriptive statistics of separate and combined rDNA's partitions

Species	rDNA lengths (bp)					Nucleotide content percentages			
	ITS1	5.8S	ITS2	ITS1+ITS2	Total length	A%	T%	C%	G%
<i>A. heterophylla</i>	268	162	249	517	679	19.0	17.7	31.7	31.47
<i>A. zollingeriana</i>	274	161	226	500	661	21.2	16.6	33.1	29.0
<i>A. kaempferi</i>	277	162	250	527	689	16.8	14.8	34.5	33.8
<i>A. foveolata</i>	293	162	226	519	681	16.6	10.1	40.8	33.0
<i>A. shimadai</i>	275	162	253	528	690	16.7	15.1	34.8	33.5
<i>A. cucurbitifolia</i>	277	162	247	524	686	16.9	15.9	33.1	34.1
<i>Asarum heterotropoides</i>	253	164	221	473	638	21.7	26.5	25.1	27.1
<i>Asarum nipponicum</i>	258	162	222	480	642	21.7	25.1	26.3	26.9

利用軟體 MEGA 分析，全段的內轉錄區間序列發現具有 424 個變異位置 (variable sites)，而鹼基對替換 (ts) 的數目為 44，在鹼基對的顛換 (tv) 數目為 59，ts 與 tv 的比值是 0.746，此值若是大於期望值 0.5，顯示此段 DNA 序列仍持續演化中 (Graur and Li 2000)。台灣 6 種馬兜鈴屬植物樣本與 2 個外群細辛和寒蕺，共 8 個物種整段 ITS 區段之遺傳距離範圍約在

0.007-0.688 之間，遺傳距離最小的是台灣馬兜鈴和大葉馬兜鈴；最大的是蜂窩馬兜鈴與寒蕺；若不計算外群，遺傳距離最大的是港口馬兜鈴與異葉馬兜鈴，值為 0.609。遺傳相似度則是與遺傳距離成反比，同樣地，台灣馬兜鈴和大葉馬兜鈴最高的遺傳相似度 0.985；港口馬兜鈴與異葉馬兜鈴具最低的遺傳相似度 0.538 (表 3)。

表 3. Tamura and Nei 模式計算全段內轉錄區間之遺傳距離與遺傳相似度

Table 3. Tamura and Nei's genetic distances (above diagonal) and genetic similarities (below diagonal) based on total ITS sequences

Species	<i>A. heterophylla</i>	<i>A. zollingeriana</i>	<i>A. kaempferi</i>	<i>A. foveolata</i>	<i>A. shimadai</i>	<i>A. cucurbitifolia</i>	<i>As. heterotropoides</i>	<i>As. nipponicum</i>
<i>A. heterophylla</i>		0.609	0.079	0.543	0.086	0.107	0.650	0.619
<i>A. zollingeriana</i>	0.538		0.524	0.335	0.537	0.535	0.677	0.681
<i>A. kaempferi</i>	0.907	0.568		0.449	0.007	0.030	0.607	0.573
<i>A. foveolata</i>	0.548	0.672	0.580		0.452	0.459	0.681	0.688
<i>A. shimadai</i>	0.897	0.565	0.985	0.580		0.030	0.606	0.572
<i>A. cucurbitifolia</i>	0.869	0.557	0.955	0.572	0.953		0.595	0.561
<i>As. heterotropoides</i>	0.496	0.501	0.507	0.489	0.509	0.506		0.067
<i>As. nipponicum</i>	0.509	0.502	0.521	0.490	0.523	0.520	0.931	

討 論

rDNA 在蛋白質合成、生物生長、發育和生殖上扮演重要的角色 (Graves *et al.* 1994)，本屬與細辛屬的 5.8S rDNA 基因區中的序列長度介於 161-164 bp，5.8S 區域的平均基因相似度 (similarity) 有 95.6%，屬於比較保守的區域；但在內轉錄區間序列中，不同物種間之長度以及序列組成常有很大變異，本研究內轉錄區間 (ITS1+ITS2) 序列長度範圍就介於 473-528 bp，平均 G+C 百分比差異高達 62.1-73.8%，鹼基比例明顯呈現不平均的現象。由於 ITS 區域隨著演化過程會保留大量的突變訊息，使得 ITS 序列有增長的現象；G+C 百分比增加，應

是生物體對環境的一種適應現象 (Nazar *et al.* 1987)。

在馬兜鈴屬的植物檢索表中，首先用葉片形態將瓜葉馬兜鈴與其他馬兜鈴獨立分開，而瓜葉馬兜鈴染色體數目為 $2n=32$ ，與大葉馬兜鈴和台灣馬兜鈴相同；在化學組成中瓜葉馬兜鈴、大葉馬兜鈴和異葉馬兜鈴，同樣是有倍半萜與多量的馬兜鈴酸和馬兜鈴內醯胺衍生物，被歸類於 *Siphisia* 亞屬中；本研究序列分析後，瓜葉馬兜鈴、大葉馬兜鈴、台灣馬兜鈴和異葉馬兜鈴為同個系群 (clade)，bootstrap 值為 100%，所以本研究之遺傳標誌已驗證形態分類的準確性。形態分類中，以管狀花彎曲形狀和花柱前端分裂的特性，將港口馬兜鈴和蜂窩

馬兜鈴歸屬於一群，其 ITS 序列相似度為 0.672、遺傳距離為 0.335，親緣樹狀圖 bootstrap 值為 100%。港口馬兜鈴和蜂窩馬兜鈴其化學組成是沒有任何倍半萜類，但含有大量的馬兜鈴酸和馬兜鈴內醯胺衍生物，化學分類與序列分析歸屬為 *Aristolochia* 亞屬相互吻合。

Watanabe *et al.* (2006) 選用 *atpB-rbcL* 與 *trnS-trnG* 的內轉錄區間的序列，以及 *matK* 的序列 (Murata *et al.* 2001) 研究馬兜鈴 *Siphisia* 亞屬的親緣關係，其先建構出最大簡約性的樹狀

圖，再構築出一致性的樹狀圖 (consensus tree)，結果可將 *Siphisia* 亞屬分為 A、B 兩個大系群，其中 B 系群又分 5 個小系群 (BI, BII, BIII, BIV 和 BV)；該研究中的 B 系群裡，台灣馬兜鈴與瓜葉馬兜鈴歸屬同一小系群 (BV)，大葉馬兜鈴歸類在其他小系群。與本研究之結果台灣馬兜鈴與大葉馬兜鈴親緣關係比較相近之結果不同 (圖 1)，可能是不同的分子標誌顯示出不同的物種演化歷史，或是取樣上可能造成的誤差。

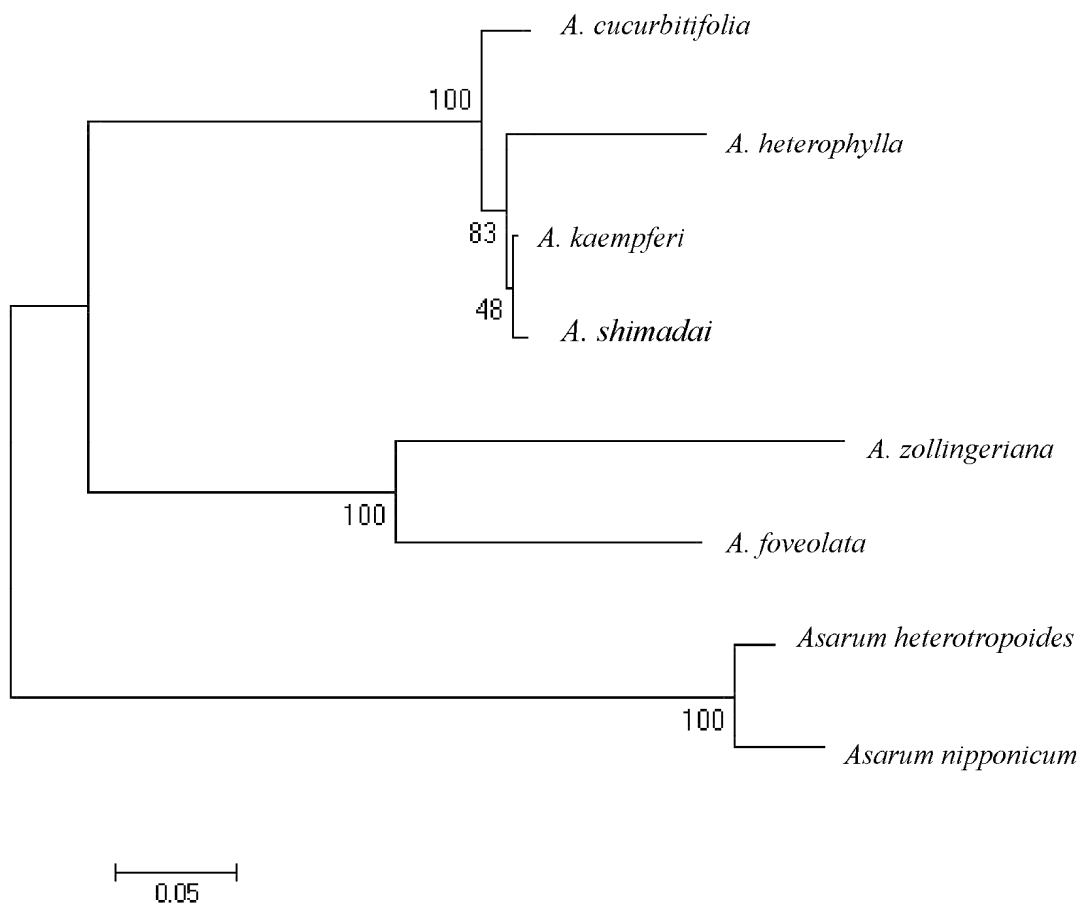


圖 1. 台灣地區馬兜鈴屬植物根據 ITS 序列建構之聚類分析親緣樹狀圖。

Fig. 1. The neighbor-joining tree of Taiwan's *Aristolochia* species based on ITS sequences.

馬兜鈴屬經過許多分類學者證實可細分為 3 個亞屬 *Aristolochia*、*Siphisia* 和 *Pararistolochia* (Schmidt 1935; Ma 1989; González 1999; González and Stevenson 2000)，本研究結果可以明確的將台灣本屬植物分為 2 個系群，經由前人的核型鑑定，除了確定瓜葉馬兜鈴、大葉馬兜鈴和台灣馬兜鈴為 *Siphisia* 亞屬外，其他物種未來仍待進一步鑑定才能更確立其分類地位。

引用文獻

- 呂勝由、郭城孟。1997。台灣稀有及瀕危植物之分級(II)。行政院農業委員會。57-58 頁。
- 呂勝由、施炳霖、陳志雄。1998。台灣稀有及瀕危植物之分級(III)。行政院農業委員會。5-6 頁。
- 吳天賞、林昭庚。2005。馬兜鈴之研究與回顧。國立中國醫藥研究所。173-174 頁。
- 吳永華。2006。台灣特有植物發現史。晨星出版社。第 73 頁。
- 彭仁傑、許再文、曾彥學、黃士元、文紀鑾、孫于卿。1993。台灣特有植物名錄。台灣省特有生物研究保育中心。第 14 頁。
- 賴明洲。1991。台灣地區植物紅皮書-稀有及瀕危植物種類之認定與保護等級之評定。行政院農業委員會。第 26 頁。
- 朝日百科。1978。世界の植物 6。朝日新聞社。第 1582 頁。
- Doyle, J. J. and J. L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.
- Fitch, W. M. 1971. Toward defining the course of evolution: Minimum change for a specific tree topology. *Systematic Zoology* 20: 406-416.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- González, F. 1999. Inflorescence morphology and the systematics of Aristolochiaceae. *Systematics and Geography of plants* 68: 159-172.
- González, F. and D. W. Stevenson. 2000. Gynostemium development in *Aristolochia* (Aristolochiaceae). *Botanische Jahrbucher für Systematik* 122: 249-291.
- Graves, D. J., B. L. Martin and J. H. Wang. 1994. Co- and Post- Translational Modification of Proteins: Chemical Principles and Biological Effects. Oxford University Press, New York.
- Graur, D. and W. H. Li. 2000. Fundamentals of Molecular Evolution. Sinauer Association, Inc., Sunderland, Massachusetts, USA.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
- Hayata, B. 1915. *Icones Plantarum Formosanarum* Volume V: 137. Bureau of Productive Industries.
- Hou, D. 1996. Aristolochiaceae. *In: Huang, T. C. et al. (eds.). Flora of Taiwan*, 2nd ed. 2: 637. Editorial Committee of the Flora of Taiwan, Taipei, Taiwan.
- Kumar, S., K. Tamura., I. B. Jakobsen and M. Nei. 2001. MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Software. Arizona State University, Arizona, USA.
- Kumar, S. K. and T. Nei. 2004. MEGA 3: Integrated Software for Molecular Evolution Genetics Analysis and Sequence Alignment Briefings in Bioinformatics 5: 150-163.
- Lee, J., B. G. Baldwin and L. D. Gottlieb. 2002. Phylogeny of *stephanomeria* and related genera (compositae-lactuceae) based on analysis of 18S-26S nuclear rDNA ITS and ETS sequences. *American Journal of Botany* 89: 160-168.

- Liu, T. S. and M. J. Lai. 1976. Aristolochiaceae. *In*: Li, H. L. *et al.* (eds.). Flora of Taiwan, 1st ed. 2: 572. Epoch Publishing Co., Ltd., Taipei, Taiwan.
- Ma, J. S. 1989. A revision of *Aristolochia* Linn. from E. & S. Asia. *Acta Phytotax. Sinica* 27: 321-364.
- Murata, J., T. Ohi., S. Wu., D. Darnaedi., T. Sugawara., T. Nakanishi and H. Murata. 2001. Molecular phylogeny of *Aristolochia* (Aristolochiaceae) inferred from matK sequences. *Acta Phytotax. Geobot.* 52: 75-83.
- Nazar, R. N., W. M. Wang and J. L. Abrahamson. 1987. Nucleotide sequence of the 18-25 S ribosomal RNA intergenic region from a thermophile, *Thermomyces lanuginosus*. *Journal of Biological Chemistry* 262: 7523-7527.
- Rauscher, J. T. 2002. Molecular phylogenetics of the *Espeletia* complex (Asteraceae): Evidence from nrDNA ITS sequences on the closest relatives of an Andean adaptive radiation. *American Journal of Botany* 89: 1074-1084.
- Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425.
- Schmidt, O. C. 1935. Aristolochiaceae. *In*: A. Engler and K. Prantl (eds.). *Die Natürlichen Pflanzenfamilien*, vol. 16b, 204-242. Leipzig, Engelmann. (in German)
- Sugawara, T. and J. Murata. 1992. Chromosome numbers of eight species of *Aristolochia* (Aristolochiaceae) from East Asia. *Acta Phytotax. Geobot.* 43: 27-30.
- Sugawara, T., J. Murata., S. Wu., T. Ohi., T. Nakanishi and H. Murata. 2001. A cytological analysis of 24 taxa in *Aristolochia* subgenera *Siphisia* and *Aristolochia* (Aristolochiaceae). *Acta Phytotax. Geobot.* 52(2): 149-158.
- Watanabe, K., T. Kajita and J. Murata. 2006. Chloroplast DNA variation and geographical structure of the *Aristolochia kaempferi* group (Aristolochiaceae). *American Journal of Botany* 93: 442-453.
- White, T. J., T. Bruns., S. Lee and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In*: PCR protocols. A Guide to Methods and Applications. p. 315-322.