

19 种马兜铃科植物的花粉形态及其分类学意义

张瑞^{1*}, 杨斌², 唐霆¹, 张淑红³, 刘文俊³, 张蕊¹

(1. 中国科学院西双版纳热带植物园公共技术中心, 云南 勐腊 666303; 2. 中国科学院东南亚生物多样性研究中心, 中国科学院西双版纳热带植物园综合保护中心, 云南 勐腊 666303; 3. 中国科学院西双版纳热带植物园园林园艺中心, 云南 勐腊 666303)

摘 要: 马兜铃科属级范畴界定争议是长期困扰该科分类学研究的核心问题, 宏观形态性状易受趋同演化干扰, 亟需补充稳定的微观特征。为明确花粉形态的分类学价值, 该研究分别选取马兜铃科关木通属 11 种 1 亚种与马兜铃属 7 种植物为对象, 采用改良 DMP 脱水制样、扫描电镜高精度观测结合多元统计分析的技术流程, 对花粉大小、形态轮廓及外壁纹饰等关键性状进行系统量化, 并通过主成分分析 (PCA) 与聚类分析 (UPGMA) 揭示其分类学意义。结果表明: (1) 研究类群花粉均为单粒近球形 ($P/E=1.02\sim1.13$), 表现出明显的科级形态保守特征。(2) 两属花粉形态分化显著, 关木通属多为中小型花粉, 极轴长 $23.21\sim28.17\mu\text{m}$, 外壁以微细网状纹饰为主; 马兜铃属以中大型花粉为主, 极轴长 $25.44\sim46.14\mu\text{m}$, 多具粗网状或脑纹状纹饰, 花粉体量与外壁纹饰类型可作为两属划分的重要鉴别依据。(3) 网眼直径 $0.17\sim0.40\mu\text{m}$ 、网脊宽度 $0.48\sim2.89\mu\text{m}$ 及极赤比等量化参数, 可有效区分近缘物种, 其中苞叶马兜铃特化的萌发沟结构、巨花马兜铃独特的脑纹状纹饰, 均为物种独特鉴别性状。(4) 主成分与聚类分析结果一致, 支持关木通属与马兜铃属独立分化, 构建的花粉大小-形状-纹饰三级量化判别体系, 可实现疑难近缘种的精准界定。本研究完善并补充了马兜铃科植物的孢粉基础数据, 优化适配了薄壁柔嫩花粉的电镜制样方法, 可为该科分类系统修订、物种划分及药用野生资源保育提供可靠的孢粉学依据, 同时也为被子植物孢粉研究由传统定性描述转向量化鉴别提供了数据。

关键词: 马兜铃科, 花粉形态, 分类鉴定, DMP 制样, 系统演化

中图分类号: Q944.42

文献标识码: A

文章编号:

Pollen morphology of 19 species of Aristolochiaceae and its taxonomic significance

ZHANG Rui^{1*}, YANG Bin², TANG Ting¹, ZHANG Shuhong³,
LIU Wenjun³, ZHANG Rui¹

(1. Institutional Center for Shared Technologies and Facilities, Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Mengla 666303, Yunnan, China; 2. Southeast Asia Biodiversity Research Institute, Chinese Academy of Sciences & Center for Integrative Conservation, Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Mengla 666303, Yunnan, China; 3. Center for Gardening and Horticulture, Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Mengla 666303, Yunnan, China)

Abstract: Persistent disputes regarding generic circumscriptions within Aristolochiaceae have long hindered taxonomic research of this family, as macroscopic morphological traits are prone to convergent evolution. This highlights an urgent need for stable micromorphological diagnostic

基金项目: 中国科学院仪器设备功能开发创新项目 (Y8GK051B01); 云南省科技厅重点研发计划建设面向南亚东南亚科技创新中心专项 (202403AK140016)。

第一作者: 张瑞 (1988—), 硕士, 工程师, 主要从事动植物显微观测, (E-mail) zhangrui2019@xtbg.ac.cn。

*通信作者

evidence. To clarify the taxonomic significance of pollen morphology, we sampled 11 species and one subspecies of *Isotrema*, alongside seven species of *Aristolochia* for this study. We employed a modified DMP dehydration preparation protocol coupled with high-resolution scanning electron microscopy (SEM) and multivariate statistical analysis to quantitatively characterize key pollen traits, including pollen size, outline shape and exine ornamentation. We further performed principal component analysis (PCA) and unweighted pair-group method with arithmetic averaging (UPGMA) clustering to reveal the taxonomic implications of pollen micromorphology. The results were as follows: (1) All pollen grains from the investigated taxa are monads and subspherical, with polar/equatorial axis ratios (P/E) of 1.02-1.13, exhibiting pronounced family-level morphological conservatism. (2) Pollen morphology differed distinctly between the two genera. *Isotrema* generally produces small to medium-sized pollen grains with polar axis of 23.21-28.17 μm , whose exine is predominantly finely reticulate. In contrast, *Aristolochia* bears medium to large pollen grains with polar axis length of 25.44-46.14 μm , characterized by coarsely reticulate or cerebriform exine ornamentation. Pollen size and exine ornamentation type constitute critical diagnostic traits for distinguishing these two genera. (3) Quantitative metrics such as lumina diameter (0.17-0.40 μm), muri width (0.48-2.89 μm) and P/E ratio enable reliable discrimination of closely related congeneric species. The distinctive germinal aperture structure of *Aristolochia bracteolata* and the unique cerebriform exine ornamentation of *A. gigantea* serve as exclusive species-specific diagnostic traits. (4) PCA and cluster analyses yielded congruent results, supporting the independent evolutionary divergence of *Isotrema* and *Aristolochia*. The established three-tier quantitative discrimination framework based on pollen size, shape and exine ornamentation enables precise delimitation of taxonomically ambiguous closely related taxa. This study enriches the fundamental palynological dataset for Aristolochiaceae, and optimizes SEM preparation protocols tailored to thin-walled, fragile pollen grains. It provides reliable palynological evidence for taxonomic revision, species boundary delimitation and conservation management of wild medicinal Aristolochiaceae resources. Moreover, this research provides baseline data to advance angiosperm palynology from traditional qualitative morphological documentation toward quantitative taxonomic identification.

Key words: Aristolochiaceae, pollen morphology, taxonomic delimitation, DMP dehydration preparation, phylogenetic evolution

马兜铃科 (Aristolochiaceae) 是被子植物中具有重要药用与生态价值的类群, 全世界 770 多种 (The Royal Botanical Gardens, Kew, 2026), 主要分布于热带、亚热带地区。在被子植物传统的分类系统中, 该科被归入原始类群范畴, 其系统位置与属间划分长期是分类学研究的焦点 (Hutchinson, 1959)。我国是该科的现代分布中心之一 (González & Stevenson, 2002), 拥有 5 属 150 多种 (<http://sp2000.org.cn/>), 但其分类学研究长期受到属级范畴争议的困扰, 尤其是马兜铃属 (*Aristolochia*) 与关木通属 (*Isotrema*) 的划分极具争议 (Nakonechnaya & Kalachev, 2018; 朱鑫鑫等, 2019; Zhu et al., 2019; The Royal Botanical Gardens, Kew, 2026)。宏观形态分类 (如花冠形态、花序结构) 易受趋同演化与种内变异的影响, 导致亲缘关系推断结果不稳定, 亟需引入遗传稳定性更高的微观特征作为补充 (Endress & Matthews, 2012; 张硕等, 2014)。花粉形态作为一种遗传稳定性极高的微观特征, 能够在宏观形态模糊时提供关键线索 (Walker & Skvarla, 1975)。近年来, 马兜铃科花粉形态学研究取得一定进展, 如 Polevova (2019) 对马兜铃属花粉外壁发育过程的观察揭示了发育时序与纹饰形成的潜在关联。然而, 现有研究多集中于少数物种的发育描述, 缺乏系统性的种间变异量化分析, 难以直接服务于分类实践。已有研究证实, 马兜铃科的花粉普

遍呈单粒、近球形且缺乏萌发孔，外壁纹饰（如颗粒状、网状）在属级乃至种级上均具备显著的区分度（米秋雯和杨春澍，1991；Perveen & Qaiser, 2008），进一步研究发现，该科植物花粉的球状体形态同样稳定，且与外壁纹饰特征高度契合，可作为分类学补充证据（Oak et al., 2022）。扫描电镜（SEM）凭借高分辨率优势，可直观呈现花粉外壁的精细纹饰结构，已在鸢尾属、荞麦属、洩疏属等类群的分类学研究中广泛应用（顾亚男等，2025；胡梦等，2025；朱莹等，2025），表明花粉形态特征是解析近缘种亲缘关系、重建系统演化历史的重要依据（张玉霞和陈庆富，2002；赵艺璇等，2021；Hayat et al., 2023；万先琴等，2025）。此外，在形态发育层面，李俊和任毅（2008）通过 SEM 观察北马兜铃（*Aristolochia contorta* Bunge）花的形态发生过程，揭示了合蕊柱裂片的雄蕊起源及中轴胎座的形成机制，为理解马兜铃科花部结构演化提供了微观证据。

尽管孢粉学方法在植物系统学中应用广泛，但马兜铃科孢粉学研究仍存在三大核心不足：一是取样覆盖度不够，现有报道多聚焦于广布种或特定地理区域类群，对国产马兜铃科物种多样性的系统覆盖不足（李俊，2008）；二是制样方法有待优化，传统方法（如自然风干、戊二醛固定）容易让高含水量、薄壁花粉发生收缩变形，外壁纹饰失真（Nakonechnaya & Kalachev, 2018；Ermolaev et al., 2024），而 2,2-二甲氧基丙烷（DMP）化学脱水法虽然在兰科、豆科等柔嫩花粉制样中表现出优势（Halbritter, 1998；赵颖，2021；Subramanyan et al., 2023），但尚未在马兜铃科中形成标准化应用流程；三是分析方法偏单一，多数研究止步于定性描述，缺乏量化指标与多元统计分析的结合，难以客观揭示类群间形态分异模式与亲缘关系。

针对上述研究缺口，本研究选取 19 种马兜铃科植物（关木通属 11 种 1 亚种、马兜铃属 7 种）为研究对象，构建“优化 DMP 制样-SEM 高精度观察-多元统计分析”的一体化研究框架。通过系统量化花粉大小、形状、外壁纹饰、萌发孔等核心特征，结合主成分分析（PCA）与层次聚类分析（UPGMA），明确花粉形态特征的分类学价值与系统演化规律，验证其对马兜铃科属级界定与种间区分的有效性（Do, 2016）。研究旨在为该科分类系统修订、物种界定及系统演化关系重建提供关键孢粉学证据，补充国产马兜铃科孢粉学基础数据，完善全球孢粉学数据库。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

供试材料采自中国科学院西双版纳热带植物园藤本园（101°16'E、21°55'N，海拔 570 m）及云南保山等地区的引种栽培或野生种群，于 2022 年 2 月至 2025 年 3 月采集盛花期成熟花粉（表 1）。每种选取 3~5 株生长健壮、无病虫害植株，采集初开的花朵，立即带回实验室制样。研究材料的物种学名基于 Zhu 等（2019）和朱鑫鑫等（2019）的分类处理观点。

表 1 供试马兜铃科植物材料

Table 1 List of Aristolochiaceae materials studied

编号 No.	中文名 Chinese name	学名 Scientific name	引种号 Accession number	采集编号 Collection number	采集时间 Collection date
1	滇南关木通	<i>Isotrema austroyunnanense</i>	00,2000,0677	zr21	2022-09-23
2	沧源关木通	<i>I. cangyuanense</i>	00,2021,0067	zr50	2024-10-16
3	翅茎关木通	<i>I. caulialatum</i>	00,2009,0263	zr23	2022-02-26
4	黄毛关木通	<i>I. fulvicomum</i>	00,2019,0665	zr48	2024-08-28
5	海南关木通	<i>I. hainanense</i>	10,2008,0028	zr25	2022-02-26

6	盈江关木通	<i>I. hainanense</i> subsp. <i>yingjiangense</i>	00,2019,1220	zr55	2025-03-03
7	南粤关木通	<i>I. howii</i>	00,2013,0428	zr46	2024-08-13
8	裴氏关木通	<i>I. petelotii</i>	00,2019,1069	zr49	2024-10-08
9	三亚关木通	<i>I. sanyaense</i>	00,2019,0679	zr17	2024-10-30
10	铜壁关关木通	<i>I. tongbiguanense</i>	00,2017,0592	zr41	2024-08-05
11	变色关木通	<i>I. versicolor</i>	00,2020,0049	zr22	2022-02-26
12	杨氏关木通	<i>I. yangii</i>	无 No	zr20	2022-09-23
13	棱茎马兜铃	<i>Aristolochia anguicida</i>	00,2020,0637	zr15	2024-10-22
14	苞叶马兜铃	<i>A. chlamydophylla</i>	00,2019,0696	zr24	2022-02-26
15	流苏马兜铃	<i>A. galeata</i>	29,2018,0032	zr42	2024-08-05
16	烟斗马兜铃	<i>A. gibertii</i>	00,2018,1856	zr45	2024-08-05
17	巨花马兜铃	<i>A. gigantea</i>	52,2010,0008	zr47	2024-08-13
18	美丽马兜铃	<i>A. littoralis</i>	2020030013	zr44	2024-08-05
19	麻雀花	<i>A. ringens</i>	04,2014,0016	zr32	2022-03-20

注：除杨氏关木通采自云南保山野生种群外，其他材料都采自 XTBG 引种栽培个体。

Note: Except for *Isotrema yangii*, which was collected from the wild population in Baoshan, Yunnan, all other materials were collected from cultivated individuals introduced and grown at XTBG.

1.2 实验方法

1.2.1 花粉样品制备

采用优化的 DMP 脱水-临界点干燥法制备花粉，具体流程如下。①花粉采集：在解剖镜下用无菌解剖针剖开成熟花药，收集花粉于 2 mL 离心管中；②化学脱水：加入 1 mL 新鲜配制的酸化 DMP 工作液[10 mL DMP（Macklin，纯度≥99%，水分<0.1%）+50 μL 浓盐酸]，室温浸泡 4 h，期间颠倒混匀 3 次，确保花粉充分接触脱水液；③漂洗纯化：加入 1 mL 无水乙醇漂洗 2 次，每次 20 min，去除残留反应产物与酸催化剂；④临界点干燥：用滤纸包裹花粉样品，转入 Leica EM CPD 300 临界点干燥仪，以液态 CO₂ 为过渡介质，参数设置为：CO₂ 注入速度 fast、延迟 400 s，置换速度 5、循环 18 次，排气加热 slow、速度 slow，避免花粉结构损伤。该优化流程相较于传统方法，可显著降低高含水量花粉的收缩变形率，有效保留外壁纹饰的原始精细结构。

1.2.2 扫描电镜观察与形态测量

（1）样品安放：将干燥后的花粉均匀散布于贴有 8 mm × 8 mm 双面导电碳胶带的铝制样品台上；（2）导电镀膜：采用 Q150RS 离子溅射仪进行多角度倾斜镀金，参数设定为溅射电流 15 mA、溅射时间 300 s，镀膜厚度控制在 8~10 nm；（3）成像优化：使用 Zeiss EVO LS10 扫描电子显微镜观察，加速电压设定为 8 kV，工作距离 12~15 mm，系统性地拍摄每个样品的极面观、赤道面观及纹饰细节图像，放大倍数范围 500×~10 000×；（4）形态测量：每种随机选取 10 个完整花粉粒测量极轴长（P）、赤道轴长（E）、网眼直径、网脊宽度等指标，计算极赤比（P/E）与花粉体积（P×E），结果以“平均值±标准差”表示。

1.2.3 形态特征界定标准

花粉形状参照王伏雄等（1995）标准：P/E 值 0.88~1.14 为近球形；花粉大小分级依据极轴长度来划分：10~25 μm 为小型，25~50 μm 为中型（埃尔特曼，1978）；外壁纹饰类型结合 SEM 观察结果与孢粉学术语（王开发和王宪曾，1983），分为颗粒状、微细网状、粗网状、脑纹状四类；网脊表面形态分为平滑型与波状型。

1.3 数据分析

利用 Microsoft Excel 2010 进行花粉形态数据统计, Adobe Photoshop 2024 进行图片处理, SPSS 27.0 软件对花粉的极轴长、赤道轴长以及网脊宽度等指标进行显著性差异分析及主成分分析,以欧氏距离 (Euclidean distance) 为测度,采用组间平均链锁法 (between-groups linkage) 进行系统聚类分析。

2 结果与分析

2.1 花粉形态特征

2.1.1 花粉大小和形状

19 种马兜铃科植物花粉均以单粒形式存在,未观察到聚合花粉现象,这与马兜铃科花粉的典型特征一致 (Nakonechnaya & Kalachev, 2018)。所有物种花粉的极赤比 (P/E) 均介于 1.02~1.13 之间,依据王伏雄等 (1995) 的花粉形状划分标准,全部归为近球形,极面观与赤道面观均呈现近圆形,显示出该科花粉形状在进化上的高度保守性 (表 2)。从属间差异来看,关木通属与马兜铃属在花粉体量上分化明显、种间差异显著 ($P<0.05$): 关木通属整体以中小型花粉为主,极轴长 23.21~28.17 μm ,赤道轴长 21.96~26.94 μm ,花粉大小 ($P\times E$) 509.63~759.54 μm^2 ,整体体量偏小且区间集中;马兜铃属以中型偏大花粉为主体,极轴长 25.44~46.14 μm ,赤道轴长 24.44~43.76 μm ,花粉大小 ($P\times E$) 622.83~2 026.67 μm^2 ,数值跨度远大于关木通属,整体花粉粒显著更大,其中苞叶马兜铃花粉大小达 2 026.67 μm^2 ,为全部类群中花粉最大物种,形成标志性鉴别特征。

关木通属和马兜铃属花粉形状虽均为近球形,但 P/E 值在属间和属内均存在一定分化。关木通属中,变色关木通 P/E 值最高 (1.13 $\pm$ 0.05),略偏向长球形,为所有物种中形状最偏长的类群;其余关木通属物种 P/E 介于 1.03~1.08,整体接近正球形。马兜铃属中,美丽马兜铃 (1.02 $\pm$ 0.03)、流苏马兜铃 (1.03 $\pm$ 0.02) 的 P/E 值最低,最接近正球形;其余马兜铃属物种 P/E 介于 1.04~1.06,整体同样以近球形为主。从变异程度看,关木通属内部 P/E 更为稳定:三亚关木通 P/E 变异系数最大 (5.66%),而翅茎关木通、铜壁关木通等多数类群变异系数 $<2\%$,花粉形状一致性显著较高。马兜铃属虽整体也为近球形,但不同物种间 P/E 覆盖范围更宽 (1.02~1.06),分化更明显,体现出花粉形状演化的多样性高于关木通属。相关性分析表明,极轴长与赤道轴长呈极显著正相关 ($r=0.986$, $P<0.001$),说明两属花粉在发育过程中极轴与赤道轴同步伸长,生长模式高度协同。综上,花粉形状的科级保守性与体量的属级分化形成鲜明对比,花粉体量可作为两属鉴别的核心指标。

2.1.2 花粉外壁纹饰

通过高分辨率 SEM 观察,将 19 种植物花粉的外壁纹饰划分为 4 种类型 (颗粒状、微细网状、粗网状、脑纹状),纹饰类型构成存在明显属间分异规律 (表 3, 图 1-图 3)。微细网状纹饰是关木通属的优势纹饰类型 (11 种),网眼直径 0.17~0.40 μm ,网脊宽度 0.48~1.72 μm ,网眼近圆形、排列均匀致密,构成关木通属花粉外壁的典型识别特征;仅苞叶马兜铃为马兜铃属内少数具微细网状纹饰的特例,与同属其他物种形成明显分化。关木通属内部纹饰微形态分化明显:黄毛关木通网眼直径最大,为 (0.40 $\pm$ 0.05) μm ,盈江关木通网眼直径最小,为 (0.17 $\pm$ 0.03) μm ,南粤关木通网脊宽度达 (1.72 $\pm$ 0.15) μm ,为关木通属网脊最大值,这些细微特征可作为属内近缘种鉴别依据。粗网状、脑纹状纹饰主要集中于马兜铃属:粗网状纹饰 (4 种) 网脊宽达 1.64~2.89 μm ,显著粗于关木通属微细网状类型,其中流苏马兜铃网脊宽度 (2.89 $\pm$ 0.69) μm 为全部物种最大;脑纹状纹饰为巨花马兜铃特有,属内首次报道该纹饰类型,其特征为无规则网眼、呈脑纹状皱褶,皱褶宽度为 (1.23 $\pm$ 0.29) μm ,纹路相互贯通,形似大脑皮层沟回,成为马兜铃属独特的花粉分类特征。颗粒状纹饰在两属均有零星分布,仅棱茎马兜铃、滇南关木通 2 种,外壁以颗粒突起为主、无清晰网眼,属于两属中演化相对特殊的纹饰类型。

从属间纹饰整体差异概括：关木通属以统一稳定的微细网状纹饰为主体，网脊中等、网眼细小均匀；马兜铃属纹饰类型多样化，粗网状、脑纹状占比高，网脊跨度更大（0.48~2.89） μm 、纹饰格局更复杂。对 16 种网状纹饰物种分析发现，网眼直径与网脊宽度无显著相关（ $r=0.234$, $P>0.05$ ），说明两属花粉网眼大小与网脊宽度受独立遗传调控；此外，网脊表面形态存在属间分化：关木通属多为平滑或细波状，马兜铃属粗网状类群多为宽波状，进一步强化了属间外壁微形态的分化特征。

2.1.3 萌发沟特征

萌发沟特征同样表现出属间分化：仅马兜铃属苞叶马兜铃观察到清晰萌发沟，位于极面，沟长为（28.6 $\pm$ 3.2） μm ，沟宽为（4.2 $\pm$ 0.5） μm ，沟缘界限清晰；其余 18 种包括全部关木通属物种及多数马兜铃属物种，均无明显可辨识萌发沟，仅美丽马兜铃、烟斗马兜铃等少数马兜铃属物种具微弱薄壁区。这一结果表明，关木通属萌发沟性状高度保守，而马兜铃属出现特化类型，体现后者花粉结构演化的多样性，与马兜铃科多为无萌发孔或萌发孔不明显的总体特征相符（Nakonechnaya & Kalachev, 2018），同时补充了两属萌发沟性状的细节差异。

表 2 19 种马兜铃科植物花粉大小与形状

Table 2 Pollen size and shape of 19 Aristolochiaceae species

编号 No.	植物材料 Plant material	极轴长 P (μm) Polar axis	赤道轴长 E (μm) Equatorial axis	极赤比 P/E	花粉形状 Pollen shape	花粉大小 Pollen size	P $\times$ E (μm^2)
1	滇南关木通 <i>Isotrema austroyunnanense</i>	25.40 $\pm$ 2.16def (22.99~28.29)	23.93 $\pm$ 1.33efgh (22.86~26.17)	1.06 $\pm$ 0.05abc	近球形 Subspheroidal	中 Medium	609.66 $\pm$ 86.54efg (525.55~740.35)
2	沧源关木通 <i>I. cangyuanense</i>	26.15 $\pm$ 1.33def (24.64~28.21)	25.09 $\pm$ 1.52cde (23.47~26.95)	1.04 $\pm$ 0.04bc	近球形 Subspheroidal	中 Medium	657.59 $\pm$ 67.21efg (593.58~760.26)
3	翅茎关木通 <i>I. caulialatum</i>	28.08 $\pm$ 1.63bcd (26.04~29.48)	26.80 $\pm$ 1.07bc (25.52~27.67)	1.05 $\pm$ 0.02bc	近球形 Subspheroidal	中 Medium	753.78 $\pm$ 72.44cde (670.53~814.53)
4	黄毛关木通 <i>I. fulvicomum</i>	25.96 $\pm$ 0.79def (24.83~26.72)	24.74 $\pm$ 0.63defg (24.17~25.78)	1.05 $\pm$ 0.04bc	近球形 Subspheroidal	中 Medium	642.14 $\pm$ 23.29efg (607.09~670.02)
5	海南关木通 <i>I. hainanense</i>	27.15 $\pm$ 0.41cde (26.75~27.80)	26.43 $\pm$ 0.89bcd (25.27~27.16)	1.03 $\pm$ 0.03c	近球形 Subspheroidal	中 Medium	717.79 $\pm$ 32.89def (675.97~755.05)
6	盈江关木通 <i>I. hainanense</i> subsp. <i>yingjiangense</i>	27.01 $\pm$ 1.07cde (25.61~28.40)	25.82 $\pm$ 1.20cd (24.18~27.17)	1.05 $\pm$ 0.02bc	近球形 Subspheroidal	中 Medium	698.44 $\pm$ 62.52def (619.25~771.63)
7	南粤关木通 <i>I. howii</i>	26.61 $\pm$ 0.79def (25.30~27.32)	24.86 $\pm$ 0.69def (24.19~25.83)	1.07 $\pm$ 0.04abc	近球形 Subspheroidal	中 Medium	661.66 $\pm$ 30.76efg (620.86~705.68)
8	裴氏关木通 <i>I. petelotii</i>	23.82 $\pm$ 0.82fg (22.78~24.91)	22.53 $\pm$ 0.69h (21.72~23.28)	1.06 $\pm$ 0.03abc	近球形 Subspheroidal	小 Small	537.07 $\pm$ 30.39g (494.78~564.31)
9	三亚关木通 <i>I. sanyaense</i>	23.21 $\pm$ 0.87fg (21.68~23.75)	21.96 $\pm$ 1.04h (20.85~23.14)	1.06 $\pm$ 0.06abc	近球形 Subspheroidal	小 Small	509.63 $\pm$ 32.28g (465.04~546.01)
10	铜壁关关木通 <i>I. tongbiguanense</i>	28.16 $\pm$ 1.13bcd (26.35~29.29)	26.94 $\pm$ 1.23bc (24.99~28.00)	1.05 $\pm$ 0.02bc	近球形 Subspheroidal	中 Medium	759.54 $\pm$ 61.60cde (658.49~810.75)
11	变色关木通 <i>I. versicolor</i>	28.17 $\pm$ 1.33bcd (27.30~30.46)	24.86 $\pm$ 0.75def (24.05~25.62)	1.13 $\pm$ 0.05a	近球形 Subspheroidal	中 Medium	700.62 $\pm$ 47.18def (658.25~780.39)

12	杨氏关木通 <i>I. yangii</i>	24.73±1.17efg (23.43~26.20)	22.79±0.93gh (21.68~23.76)	1.08±0.05ab	近球形 Subspheroidal	小 Small	563.82±40.56fg (507.96~615.96)
13	棱茎马兜铃 <i>Aristolochia anguicida</i>	25.44±1.20def (24.37~26.78)	24.44±1.19efg (23.50~26.45)	1.04±0.03bc	近球形 Subspheroidal	中 Medium	622.83±57.22efg (574.11~705.69)
14	苞叶马兜铃 <i>A. chlamydophylla</i>	46.14±2.92a (43.94~49.50)	43.76±3.63a (39.85~48.59)	1.05±0.04bc	近球形 Subspheroidal	中 Medium	2026.67±267.49a (1751.01~2371.19)
15	流苏马兜铃 <i>A. galeata</i>	34.95±1.28b (33.45~36.30)	33.86±1.59b (31.57~35.50)	1.03±0.02c	近球形 Subspheroidal	中 Medium	1185.05±95.75b (1056.02~1288.65)
16	烟斗马兜铃 <i>A. gibertii</i>	39.04±2.81b (34.90~42.20)	37.68±3.41b (32.31~41.77)	1.04±0.03bc	近球形 Subspheroidal	中 Medium	1478.42±231.61b (1127.62~1762.69)
17	巨花马兜铃 <i>A. gigantea</i>	36.88±1.11b (35.80~38.13)	34.95±0.45b (34.21~35.40)	1.06±0.03abc	近球形 Subspheroidal	中 Medium	1289.14±48.70b (1233.27~1349.80)
18	美丽马兜铃 <i>A. littoralis</i>	37.58±3.90b (33.03~41.22)	36.77±3.89b (33.04~40.83)	1.02±0.03c	近球形 Subspheroidal	中 Medium	1393.30±285.01b (1093.29~1683.01)
19	麻雀花 <i>A. ringens</i>	31.23±0.81b (29.90~32.09)	29.61±1.10b (28.43~31.10)	1.06±0.04abc	近球形 Subspheroidal	中 Medium	924.97±48.61bcd (874.28~978.72)

注：同列不同小写字母表示差异显著（*P*<0.05）。括号内为最小值至最大值。
Note: Different lowercase letters within the same column indicate significant differences (*P*<0.05). Values in parentheses are minimum to maximum.

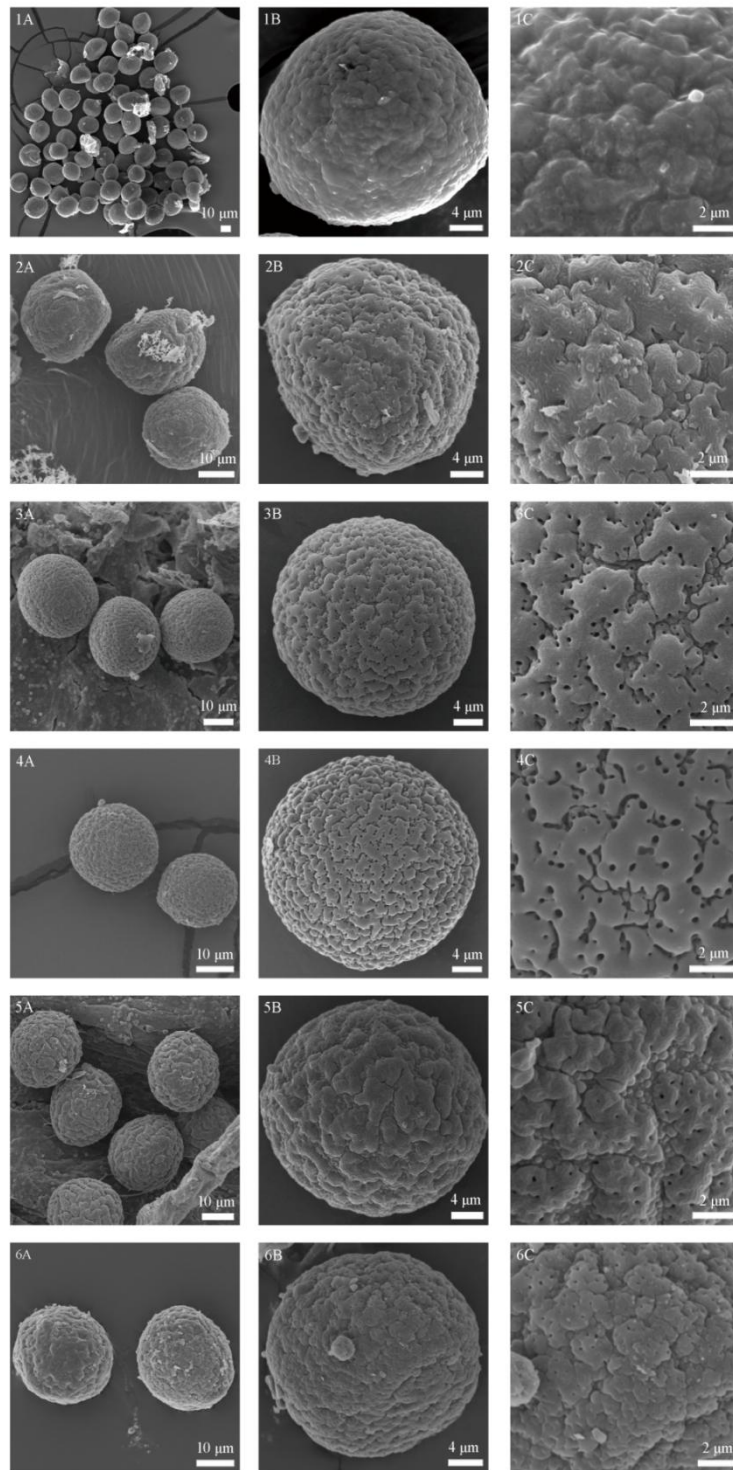
表 3 19 种马兜铃科植物花粉形态特征
Table 3 Pollen morphological characteristics of 19 Aristolochiaceae species

编号 No.	植物材料 Plant material	萌发沟 Colpi	网眼 Lumen	网眼形状 Lumen shape	网眼大小 Lumen size	网脊 Murus	网脊宽度 Murus width (μm)	网眼直径 Lumen diameter (μm)	网眼宽 Lumen width (μm)	外壁纹饰 Exine ornamentation
1	滇南关木通 <i>Isotrema austroyunnanense</i>	未观察到 Not observed	—	—	—	平滑, 宽 Smooth, wide	0.84±0.15gh (0.68~1.04)	—	—	颗粒状 Granulate
2	沧源关木通 <i>I. cangyuanense</i>	未观察到 Not observed	有 Present	近圆形 Subround	较小 Smaller	宽 Wavy, wide	0.84±0.19gh (0.62~1.08)	0.35± (0.25~0.43)	0.22±0.05bc (0.14~0.28)	微细网状 Microreticulate
3	翅茎关木通 <i>I. caulialatum</i>	未观察到 Not observed	有 Present	近圆形 Subround	较小 Smaller	窄 Wavy, narrow	0.90±0.33fgh (0.40~1.25)	0.30± (0.27~0.39)	0.20±0.04cd (0.15~0.24)	微细网状 Microreticulate
4	黄毛关木通 <i>I. fulvicomum</i>	未观察到 Not observed	有 Present	近圆形 Subround	较小 Smaller	窄 Wavy, narrow	0.83±0.18gh (0.62~1.06)	0.40± (0.32~0.44)	0.05a (0.32~0.41)	微细网状 Microreticulate

5	海南关木通 <i>I. hainanense</i>	未观察到 Not observed	有 Present	近圆形 Subround	较小 Smaller	波状, 窄 Wavy, narrow	0.72±0.15hi (0.64~0.99)	0.27± 0.02cde (0.23~ 0.28)	0.21±0.01bc d (0.20~0.23)	微细网状 Microreticulate
6	盈江关木通 <i>I. hainanense</i> subsp. <i>yingjiangense</i>	未观察到 Not observed	有 Present	近圆形 Subround	较小 Smaller	平滑, 窄 Smooth , narrow	0.69±0.12hi (0.55~0.88)	0.17± 0.03e (0.13~ 0.20)	0.14±0.02e (0.13~0.18)	微细网状 Microreticulate
7	南粤关木通 <i>I. howii</i>	未观察到 Not observed	有 Present	近圆形 Subround	较小 Smaller	波状, 窄 Wavy, narrow	1.72±0.15c (1.51~1.92)	0.19± 0.02e (0.18~ 0.23)	0.18±0.03de (0.16~0.23)	微细网状 Microreticulate
8	裴氏关木通 <i>I. petelotii</i>	未观察到 Not observed	有 Present	近圆形 Subround	较小 Smaller	平滑, 窄 Smooth , narrow	0.88±0.16fgh (0.68~1.04)	0.32± 0.09b (0.24~ 0.48)	0.21±0.03bc d (0.18~0.26)	微细网状 Microreticulate
9	三亚关木通 <i>I. sanyaense</i>	未观察到 Not observed	有 Present	近圆形 Subround	较小 Smaller	波状, 窄 Wavy, narrow	0.59±0.07i (0.51~0.69)	0.27± 0.07cde (0.20~ 0.37)	0.19±0.03cd e (0.14~0.21)	微细网状 Microreticulate
10	铜壁关木通 <i>I. tongbiguanense</i>	未观察到 Not observed	有 Present	近圆形 Subround	较小 Smaller	波状, 窄 Wavy, narrow	0.74±0.19hi (0.53~1.04)	0.24± 0.07cde (0.16~ 0.31)	0.18±0.04de (0.14~0.24)	微细网状 Microreticulate
11	变色关木通 <i>I. versicolor</i>	未观察到 Not observed	有 Present	近圆形 Subround	较小 Smaller	波状, 窄 Wavy, narrow	0.73±0.20hi (0.43~0.91)	0.23± 0.04de (0.18~ 0.26)	0.19±0.04cd e (0.14~0.24)	微细网状 Microreticulate
12	杨氏关木通 <i>I. yangii</i>	未观察到 Not observed	有 Present	近圆形 Subround	较小 Smaller	平滑, 窄 Smooth , narrow	0.66±0.11hi (0.56~0.85)	0.19± 0.04e (0.16~0. 25)	0.14±0.01e (0.12~0.15)	微细网状 Microreticulate
13	棱茎马兜铃 <i>Aristolochia</i> <i>anguicida</i>	未观察到 Not observed	—	—	—	平滑, 宽 Smooth , wide	0.92±0.14fgh (0.69~1.05)	—	—	颗粒状 Granulate
14	苞叶马兜铃 <i>A. chlamydophylla</i>	可见 1 沟 One colpus, visible	有 Present	近圆形 Subround	较小 Smaller	平滑, 窄 Smooth , narrow	0.48±0.05i (0.43~0.56)	0.24± 0.03cde (0.19~0. 28)	0.18±0.02de (0.16~0.22)	微细网状 Microreticulate

15	流苏马兜铃 <i>A. galeata</i>	未观察到 Not observed	—	—	—	波状, 宽 Wavy, wide	2.89±0.69a (2.14~3.92)	—	—	粗网状 Coarsely reticulate
16	烟斗马兜铃 <i>A. gibertii</i>	未观察到 Not observed	有 Present	近圆形 Subround	较小 Smaller	平滑, 宽 Smooth , wide	1.64±0.32cd (1.34~2.10)	0.23± 0.06de (0.14~0.29)	0.19±0.05cd e (0.13~0.27)	粗网状 Coarsely reticulate
17	巨花马兜铃 <i>A. gigantea</i>	未观察到 Not observed	—	—	—	平滑, 宽 Smooth , wide	1.23±0.29de (0.90~1.61)	—	—	脑纹状 Cerebroid
18	美丽马兜铃 <i>A. littoralis</i>	未观察到 Not observed	有 Present	近圆形 Subround	较小 Smaller	波状, 宽 Wavy, wide	1.75±0.24c (1.46~1.98)	0.32± 0.08b (0.19~0.42)	0.22±0.04bc (0.17~0.27)	粗网状 Coarsely reticulate
19	麻雀花 <i>A. ringens</i>	未观察到 Not observed	有 Present	近圆形 Subround	较小 Smaller	波状, 宽 Wavy, wide	2.07±0.22b (1.65~2.24)	0.21± 0.01de (0.19~0.22)	0.14±0.03e (0.10~0.18)	粗网状 Coarsely reticulate

注：网眼直径<0.70 μm 为较小网眼。
 Note: Lumen diameter < 0.70 μm indicates a small lumen.

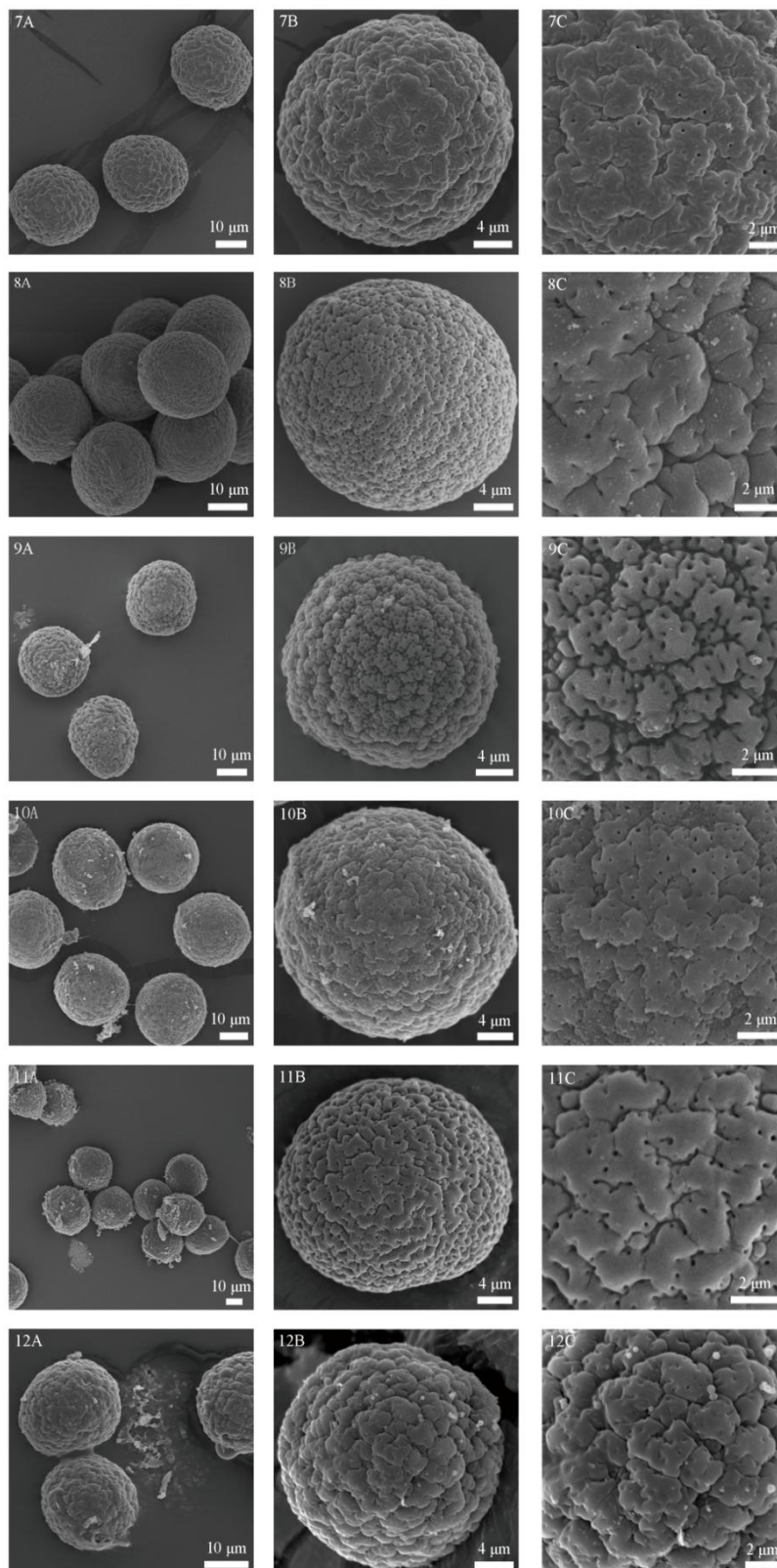


1. 滇南关木通；2. 沧源关木通；3. 翅茎关木通；4. 黄毛关木通；5. 海南关木通；6. 盈江关木通。A. 花粉整体状态；B. 极面观；C. 外壁纹饰。下同。

1. *Isotrema austroyunnanense*; 2. *I. cangyuanense*; 3. *I. caulialatum*; 4. *I. fulvicomum*; 5. *I. hainanense*; 6. *I. hainanense* subsp. *yingjiangense*. A. General pollen morphology; B. Polar view; C. Exine ornamentation. The same below.

图1 扫描电镜下6种关木通属植物的花粉形态

Fig. 1 Pollen morphology of six species of *Isotrema* under SEM (I)

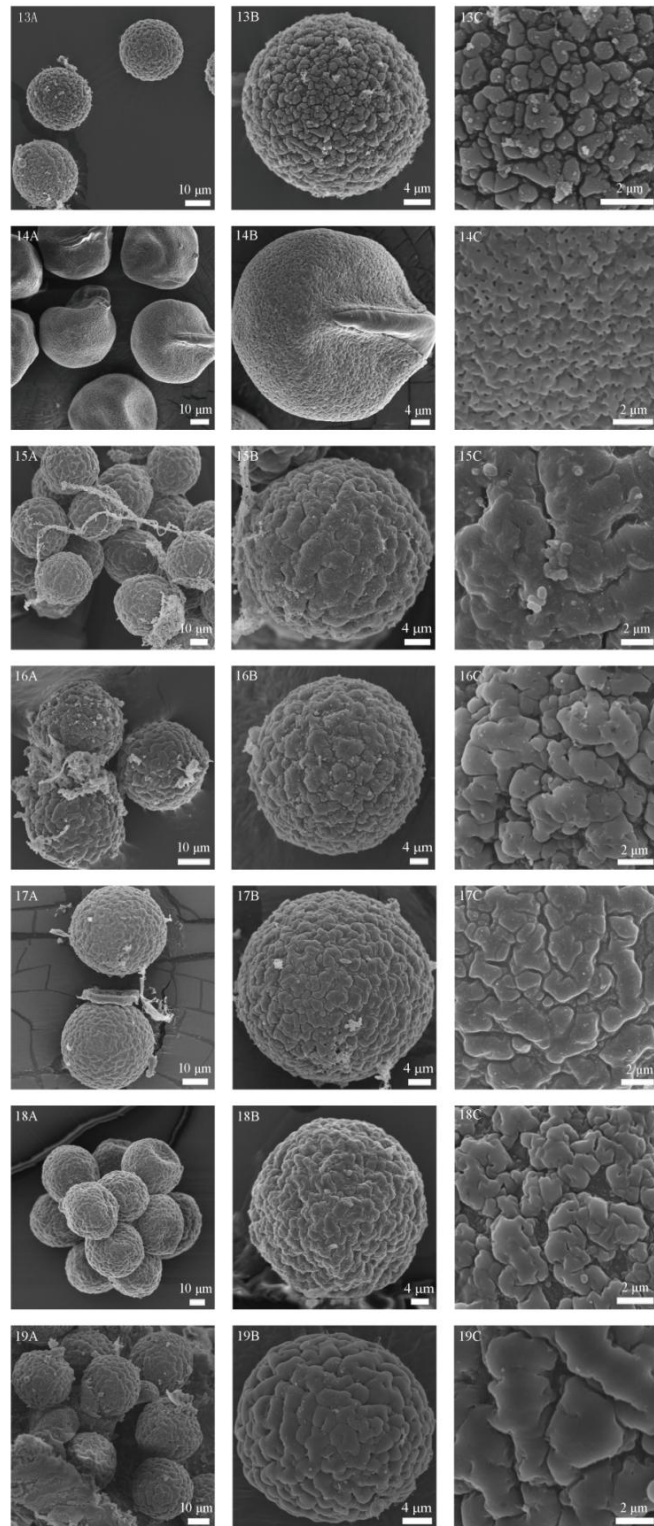


7. 南粤关木通; 8. 裴氏关木通; 9. 三亚关木通; 10. 铜壁关木通; 11. 变色关木通; 12. 杨氏关木通。

7. *Isotrema howii*; 8. *I. petelotii*; 9. *I. sanyaense*; 10. *I. tongbiguanense*; 11. *I. hainanense*; 12. *I. yangii*.

图2 扫描电镜下6种关木通属植物花粉形态

Fig. 2 Pollen morphology of six species of *Isotrema* under SEM (II)



13. 棱茎马兜铃; 14. 苞叶马兜铃; 15. 流苏马兜铃; 16. 烟斗马兜铃; 17. 巨花马兜铃; 18. 美丽马兜铃;
19. 麻雀花。

13. *Aristolochia anguicida*; 14. *A. chlamydophylla*; 15. *A. galeata*; 16. *A. gibertii*; 17. *A. gigantea*; 18. *A. littoralis*;
19. *A. ringens*.

图3 扫描电镜下7种马兜铃属植物花粉形态

Fig. 3 Pollen morphology of seven species of *Aristolochia* under SEM (III)

2.2 多元统计分析

2.2.1 主成分分析（PCA）

对 19 种马兜铃科植物的 5 个关键形态学指标（极轴长、赤道轴长、P/E 值、花粉大小、网脊宽度）进行主成分分析（PCA），KMO 取样适切性量数为 0.495，略低于 0.6 的常规推荐阈值，但巴特利特球形度检验达到极显著水平（ $P<0.001$ ），表明各形态指标间存在显著关联性，满足主成分分析的基本要求。结果显示，前三个主成分累计贡献率达 99.935%（表 4），说明这 3 个主成分几乎包含了 5 个花粉形态指标的全部信息，可有效代表原变量进行后续分析。经最大方差法（Varimax）旋转后，各主成分的载荷矩阵（表 5）揭示了显著的特征权重分配：

第一主成分（PC1）贡献率为 66.203%，主要由极轴长（载荷 0.983）、赤道轴长（载荷 0.967）、花粉大小（载荷 0.984）主导，均具有极高的正载荷，而 P/E 值（载荷 -0.167）和网脊宽度（载荷 0.180）的贡献较小，表明 PC1 主要反映花粉整体大小的变异，可定义为“花粉大小因子”。从得分来看，关木通属物种 PC1 得分集中于 -0.92~0.05，全部为负值或接近 0；马兜铃属物种得分跨度更大，其中苞叶马兜铃得分最高（2.97），烟斗马兜铃（1.40）、美丽马兜铃（1.06）次之，仅棱茎马兜铃（-0.74）、麻雀花（0.01）得分与关木通属重叠，两属得分区间整体呈明显分离趋势，验证了“花粉大小是两属最核心的分化指标”。第二主成分（PC2）贡献率为 19.698%，主要由极赤比（P/E）主导，载荷最高量为 0.976，其他指标的载荷绝对值均小于 0.2，表明 PC2 主要反映花粉的形状特征，可定义为“花粉形状因子”。该主成分的分化主要体现在属内近缘种间：关木通属中变色关木通因 P/E 值最高（1.13），PC2 得分（3.30）显著高于同属其他物种；马兜铃属中美丽马兜铃因 P/E 值最低（1.02），PC2 得分（-1.22）最低，流苏马兜铃（-0.61）次之，与同属其他物种形成差异，说明 PC2 可作为近缘种鉴别的辅助因子。第三主成分（PC3）贡献率为 14.033%，核心驱动指标为网脊宽度（载荷 0.974），表明 PC3 主要反映花粉外壁纹饰特征（网脊宽度），可定义为“花粉纹饰因子”。关木通属物种 PC3 得分集中于 -0.69~1.22，（南粤关木通得分最高），马兜铃属得分跨度更大（-1.58~2.77），流苏马兜铃（网脊最宽）与苞叶马兜铃（网脊最窄）形成极端分化，强化纹饰的分类学价值。

主成分得分分布显示，关木通属 12 种植物集中分布于 PC1 低得分区，马兜铃属 7 种植物集中分布于 PC1 高得分区，仅棱茎马兜铃、麻雀花因花粉大小接近关木通属，分布于两属重叠区域，这与聚类分析的“跨界聚类”结果一致。综合来看，花粉大小（PC1 主导）和网脊宽度（PC3 主导）是两属花粉形态分化的核心驱动因子，极赤比（PC2 主导）则为属内近缘种鉴别提供关键补充，三者共同构成马兜铃科两属及近缘种花粉形态鉴别的指标体系。

表 4 19 种马兜铃科植物花粉特征前 3 个主要成分贡献率

Table 4 Contribution ratio of the first three major components of pollen characteristics from 19 Aristolochiaceae plants

主成分 Principal component	PC1	PC2	PC3
特征值 Eigenvalue	3.310	0.985	0.702
贡献率 Contribution ratio (%)	66.203	19.698	14.033
累计贡献率 Total contribution ratio (%)	66.203	85.901	99.935

表 5 19 种马兜铃花粉特征主成分矩阵

Table 5 Principal component matrix of pollen characteristics of 19 Aristolochiaceae plants

主成分 Principal component	PC1	PC2	PC3
极轴长 Polar axis length (P)	0.983	-0.093	0.158
赤道轴 Equatorial axis length (E)	0.967	-0.186	0.173
极赤比 P/E	-0.167	0.976	-0.138
花粉大小 Pollen size (P × E)	0.984	-0.134	0.106
网脊宽度 Width of muri	0.180	-0.139	0.974

2.2.2 聚类分析

基于上述 5 个形态指标的标准化数据，采用欧氏距离系数和组间平均链锁法（UPGMA）构建树状图（图 4），结果显示，在欧氏距离 15 的水平上，所有物种清晰划分为 4 个类型。聚类结果既清晰呈现属间分化格局，又揭示了属内近缘种的亲缘关系，与 PCA 结果高度契合，既呈现属间分化格局，又揭示属内近缘种亲缘关系。

类型I：包含 11 种关木通属植物及 2 种马兜铃属物种（棱茎马兜铃和麻雀花）。欧式距离 5~10 时可进一步分为 2 个亚类，亚类 Ia（10 种关木通属植物及棱茎马兜铃）中，盈江关木通与海南关木通、裴氏关木通与三亚关木通的种间遗传距离最小，花粉形态高度相似，为亲缘关系最近的物种组合；此外，马兜铃属的棱茎马兜铃因花粉大小（ $622.83 \mu\text{m}^2$ ）、网脊宽度（ $0.92 \mu\text{m}$ ）与该亚类关木通属物种的特征高度契合，聚类于该支系，体现了趋同进化导致的花粉形态相似性。亚类 Ib（南粤关木通和麻雀花）因网脊宽度与花粉大小特征趋同而跨界聚类，体现趋同演化的影响。

类型II：仅变色关木通 1 种，因 P/E 值最高（1.13）独立成支，与核心类群遗传距离较远，支持其独立近缘种地位。

类型III：包含 4 种马兜铃属植物（烟斗马兜铃、美丽马兜铃、巨花马兜铃、流苏马兜铃），欧式距离 5~10 时分为 2 个亚类，体现属内近缘种分化：亚类 IIIc（3 种）：烟斗马兜铃、美丽马兜铃与巨花马兜铃三者亲缘关系最近，形态最为接近，花粉大小、网脊宽度差异较小，仅纹饰类型存在分化，花粉大小（ $1289.14 \mu\text{m}^2 \sim 1478.42 \mu\text{m}^2$ ）、网脊宽度（ $1.23 \mu\text{m} \sim 1.75 \mu\text{m}$ ）差异较小，仅纹饰类型（粗网状 vs 脑纹状）存在分化；亚类 III d（流苏马兜铃）因网脊宽度最大（ $2.89 \mu\text{m}$ ）单独成支。

类型 IV：仅含苞叶马兜铃 1 种，以超大花粉体积（ $2026.67 \mu\text{m}^2$ ）、特化微细网状纹饰及萌发沟结构独立成支，与同属其他物种显著隔离，体现高度特化的演化特征。

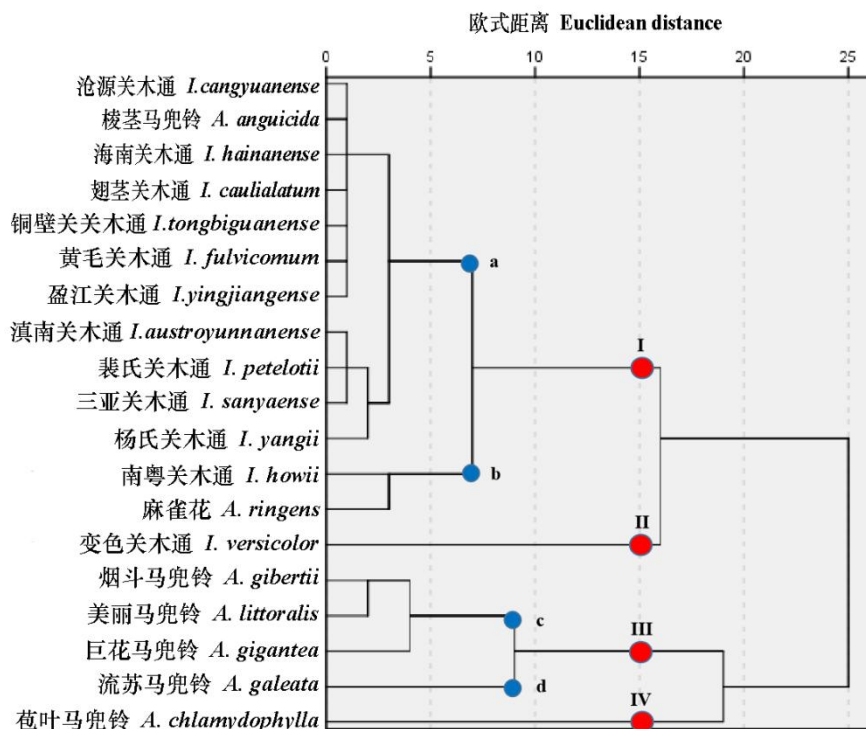


图 4 19 种马兜铃科植物花粉形态聚类分析

Fig. 4 Cluster analysis of pollen morphology of 19 species of Aristolochiaceae

3 讨论

3.1 花粉形态特征的分类学价值

本研究结合改良电镜制样、高分辨扫描观测与多元统计分析，系统揭示了马兜铃科花粉形态科级保守、属级分异、种级特异的分层形态规律，可为该科分类修订提供稳定孢粉学证据。科级层面，该科全部物种花粉均为单粒近球形，不形成聚合花粉，与 Erdtman (1952) 建立的经典孢粉学结论吻合，也和近年分子系统学的科级划分结果相互印证 (Nakonechnaya & Kalachev, 2018)。属间分化主要体现在花粉大小与外壁纹饰的组合特征上：关木通属以中小型花粉搭配细弱网状纹饰为稳定鉴别特征，马兜铃属则多为中大型花粉，外壁呈粗网状或脑纹状，两属孢粉特征界限清晰。这一分化规律既符合传统形态分类观点，也与叶绿体基因组揭示的属级谱系分支关系高度一致 (Ohi-Toma et al., 2006; 朱鑫鑫等, 2019)，种内及近缘物种可依托网眼孔径、网脊宽度、极赤比 (P/E) 等量化参数实现精细划分。例如盈江关木通网眼直径为 $(0.17 \pm 0.03) \mu\text{m}$ ，海南关木通达 $(0.27 \pm 0.02) \mu\text{m}$ ，纹饰孔径差异显著；流苏马兜铃具 $(2.89 \pm 0.69) \mu\text{m}$ 的宽网脊特有结构。这些量化孢粉特征，可为近缘物种的精准鉴定提供可观测、可重复的参考标准。

本研究构建的大小-形状-纹饰三级量化判别框架，通过主成分分析 (PCA) 筛选出花粉大小、纹饰复杂度及萌发孔形态等关键分类指标，再结合系统聚类分析 (UPGMA) 对类群亲缘关系进行可视化校验，弥补了传统孢粉仅依靠定性描述、人为主观判定的缺陷。这一研究思路与溲疏属 (顾亚男等, 2025)、荞麦属 (胡梦等, 2025)、鸢尾属 (朱莹等, 2025) 等被子类群的孢粉量化研究模式相近，可为同类研究提供参照，推动被子植物孢粉学向定量鉴别转型。同时，本研究还发现棱茎马兜铃、麻雀花等物种的花粉形态在聚类结果中存在属间交叉聚类现象。说明花粉作为演化保守的微观性状，形态分化速率往往滞后于分子谱系分化节奏，仅依靠单一孢粉证据难以完全厘清属级范畴争议，分类修订需整合形态、分子、生态多维度信息 (González et al., 2001)。

3.2 花粉形态的系统演化与生态适应

参照 Walker & Skvarla (1975) 提出的被子植物花粉由简单结构向复杂纹饰演进的演化规律, 结合外壁纹饰类型及聚类分析结果, 本研究初步梳理出马兜铃科花粉纹饰的演化主线: 颗粒状→微细网状→粗网状; 其中巨花马兜铃脑纹状纹饰为适应特殊传粉方式形成的独立特化类型。以颗粒状或微细网状纹饰、小型花粉为特征的类群演化地位相对原始; 马兜铃属核心类群具粗网状纹饰且花粉体量偏大, 属于演化上较衍生的类群; 苞叶马兜铃拥有超大花粉体积、特化萌发沟及复杂外壁纹饰, 构成独立特化支系, 其花粉形态分化与传粉模式、生境适应形成明显协同进化, 体现了微观结构与生态功能的高度适配。

马兜铃科以蝇、蛾类虫媒传粉为主, 近球形花粉可提升在昆虫体表的附着效率 (Matallana-Puerto et al., 2024); 两属花粉大小分化与传粉策略密切相关: 关木通属小型花粉更适宜泛化传粉者远距离传播; 马兜铃属大型花粉则更适配专性传粉昆虫的定点授粉过程。外壁纹饰的微形态差异进一步反映了类群的生境适应特性: 关木通属花粉表面细密的微细网状纹饰, 可减少林下湿润环境中花粉表面的水分滞留, 从而降低花粉失活风险; 马兜铃属的粗网状或脑纹状纹饰则通过增强花粉壁的机械强度, 提升了花粉在开阔生境或干旱条件下的抗逆能力 (Walker, 1971)。此外, 变色关木通等物种呈现形态性状与分子谱系不完全耦合的特征, 印证了花粉形态的演化保守性, 其形态分化进程慢于遗传分化速率, 进一步说明多证据整合分析在演化机制研究中的必要性。

3.3 DMP 改良制样技术优化效果与方法学对比分析

马兜铃科花粉壁薄、含水量高, 采用常规戊二醛梯度脱水或自然风干极易发生皱缩、外壁网脊塌陷, 纹饰边界模糊, 形态测量误差偏大, 这也是以往该类群难以开展定量孢粉分析的关键技术瓶颈 (Nakonechnaya & Kalachev, 2018)。本研究以 Halbritter (1998) 建立的 DMP 脱水体系为基础, 针对马兜铃科材料优化脱水液配比、浸泡时长、漂洗流程及临界点干燥参数, 建立适配薄壁柔嫩花粉的标准化前处理流程。采用传统制样方法处理的花粉普遍存在形态畸变, 外壁微结构扭曲失真, 难以精准测量网眼、网脊等细微特征; 而经改良 DMP 流程处理的花粉整体轮廓完整, 各类形态指标重复性良好, 网眼、网脊、特化萌发沟等精细微结构均可清晰、稳定量化。完整保存的外壁纹饰细节是搭建三级判别体系、开展主成分与聚类分析的数据根基, 若沿用传统制样手段, 花粉结构畸变会直接干扰属、种级分化特征判定。

该改良流程无需锇酸等剧毒固定试剂, 操作简便, 可推广应用于胡椒目其他薄壁花粉类群的 SEM 观测。但该方法存在适用限制: 仅适用于新鲜盛花期花粉, 无法修复馆藏干制标本的不可逆形变; 若花粉表面附着大量蜜腺分泌物, 观测前需增加脱脂预处理; 该流程仅满足扫描电镜表面形貌观察, 若解析外壁超微结构仍需配套透射电镜专用固定与包埋体系。这套标准化前处理方案能够统一不同实验室的花粉观测标准, 降低前处理带来的人为测量偏差, 填补国内马兜铃科专用孢粉制样技术空白, 也可为其他薄壁药用植物的定量孢粉研究提供技术范式, 助力孢粉学定量分析体系规范化发展。

3.4 结论

本研究存在三方面创新: 一是对 DMP 电镜样品前处理整套操作流程进行改良, 解决了马兜铃科薄壁、高含水量花粉制片时容易变形的难题, 最大程度完整留存花粉外壁表面纹饰细节; 二是整合显微形态观测、孢粉量化测量与多元统计分析搭建物种判别体系, 有效提高近缘种类的分辨准确率; 三是完成 19 种马兜铃科花粉形态量化指标测定, 首次记录巨花马兜铃脑纹状外壁、苞叶马兜铃特化萌发沟两类特征, 补充完善该区域马兜铃科孢粉基础数据。

综上所述, 马兜铃科花粉整体科级特征稳定保守, 不同属间花粉形态差异突出, 种与种之间依靠细微花粉特征就能清晰区分; 花粉整体大小、极赤比值、外壁纹饰形态, 还有网眼、网脊的尺度参数, 都可以作为物种鉴定、亲缘关系推演的核心孢粉依据。本文搭建的定量判

别分析框架,能够规避传统仅依靠肉眼定性描述产生的主观偏差,让亲缘关系相近、难以区分的物种鉴定结果更稳定可靠。从孢粉形态证据能够看出,关木通属和马兜铃属亲缘联系十分密切,二者共享的基础花粉特征来源于共同祖先;而两类花粉在体积、外壁纹饰上出现明显分化,是两属为适应不同生存环境发生辐射演化造成的。像脑纹外壁、特化萌发沟、极端大小花粉这类特殊微观结构,能够当作部分物种独立演化的识别标志,也为马兜铃科系统发育演化重构提供关键微观证据。主成分分析与系统聚类得出的结论可以互相佐证,厘清长期以来关木通属与马兜铃属划分存在的争议,细化属内近缘物种亲缘关系,能够为马兜铃科分类系统修订、物种名称订正以及野生珍稀种质资源保护工作提供孢粉学层面的理论支撑。同时,本研究建立的薄壁花粉标准化前处理方法,以及定性观测、定量测算、统计验证相结合的分析思路,拓展了被子植物孢粉学研究方法,对其他薄壁花粉植物的微观形态研究具有借鉴与推广意义。

致谢: 感谢中国科学院西双版纳热带植物园园林园艺中心在花粉材料采集过程中提供的便利;感谢中国科学院西双版纳热带植物园公共技术中心在扫描电镜使用方面提供的技术支持。

参考文献:

- Do V T, 2016. Notes on taxonomy of *Aristolochia impressinervis* C.F.Liang (Aristolochiaceae) from Vietnam [J]. Guihaia, 36(4): 503-506. [Do Van Truong, 2016. 越南马兜铃属植物分布新记录——凹脉马兜铃(英文)[J]. 广西植物, 36(4): 503-506.]
- Ermolaev A, Mardini M, Buravkov S, et al., 2024. A simple and user-friendly method for high-quality preparation of pollen grains for scanning electron microscopy (SEM) [J]. Plants, 13(15): 2140.
- Erdtman G, 1952. Pollen morphology and plant taxonomy [M]. Stockholm: Almqvist & Wiksell: 31-50.
- Erdtman G, 1978. Handbook of palynology [M]. Beijing: Science Press: 13-16. [埃尔特曼, 1978. 孢粉学手册 [M]. 北京: 科学出版社: 13-16.]
- Endress P K, Matthews M L. 2012. Progress and problems in the assessment of flower morphology in higher-level systematics [J]. Plant Systematics and Evolution, 298(2): 257-276.
- González F, Rudall P J, Furness C A, 2001. Microsporogenesis and systematics of *Aristolochiaceae* [J]. Botanical Journal of the Linnean Society, 137(3): 221-242.
- González F A, Stevenson D W, 2002. A phylogenetic analysis of the subfamily *Aristolochioideae* (Aristolochiaceae) [J]. Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, 26(98): 25-60.
- Gu Y N, Hu X Y, Li A M, et al., 2025. Pollen morphological and taxonomic study on 13 *Deutzia* plants [J]. Guihaia, 45(5): 872-885. [顾亚男, 胡晓雨, 李爱民, 等, 2025. 13 种溲疏属植物的花粉形态与分类研究 [J]. 广西植物, 45(5): 872-885.]
- Halbritter H, 1998. Preparing living pollen material for scanning electron microscopy using 2,2-dimethoxypropane (DMP) and critical-point drying [J]. Biotechnic & Histochemistry, 73(3): 137-143.
- Hayat K, Khan W M, Khan M N, et al., 2023. Pollen morphological investigation of selected species of family Asteraceae from Pakistan by using light and scanning electron microscopy [J]. Microscopy Research and Technique, 86: 1258-1273.
- Hu M, Tan L, Wang Q H, et al., 2025. Pollen morphology and taxonomic significance of 11 *Fagopyrum* species (Polygonaceae) from China [J]. Guihaia, 45(12): 2296-2307. [胡梦, 谭露,

- 王清海, 等, 2025. 中国荞麦属 11 种植物的花粉形态及其分类学意义 [J]. 广西植物, 45(12): 2296-2307.]
- Hutchinson J, 1959. The families of flowering plants [M]. 2nd ed. Oxford: Clarendon Press: 158-160.
- Li J, Ren Y, 2008. Floral morphogenesis of *Aristolochia* L. (Aristolochiaceae) [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 28(2): 267-271. [李俊, 任毅, 2008. 马兜铃属 (马兜铃科) 花的形态发生研究 [J]. 西北植物学报, 28(2): 267-271.]
- Li J, 2008. A comparative morphological study on *Aristolochiaceae* plants in China [D]. Xi'an: Shaanxi Normal University: 29-30. [李俊, 2008. 国产马兜铃科 (Aristolochiaceae) 植物比较形态学研究 [D]. 西安: 陕西师范大学: 29-30.]
- Matallana-Puerto C A, Brito V L G, Kuster V C, et al., 2024. Sex, flies and flower trap: Trapping trichomes and their function in pollination [J]. Functional Ecology, 38(10): 2261-2270.
- Mi Q W, Yang C S, 1991. Pollen morphology of *Asarum* (Aristolochiaceae) from China [J]. Acta Phytotaxonomica Sinica, 29(2): 164-171. [米秋雯, 杨春澍, 1991. 中国细辛属花粉形态研究 [J]. 植物分类学报, 29(2): 164-171.]
- Nakonechnaya O V, Kalachev A V, 2018. Pollen ultrastructure in *Aristolochia manshuriensis* and *A. contorta* (Aristolochiaceae) [J]. Protoplasma, 255(5): 1309-1316.
- Oak M K, Yang S, Choi G, et al., 2022. Systematic palynology in Korean Piperales with special focus on its exine surface ornamentation and orbicule morphology [J]. Scientific Reports, 12(1): 4142.
- Ohi-Toma T, Sugawara T, Murata H, et al., 2006. Molecular phylogeny of *Aristolochia* sensu lato (Aristolochiaceae) based on sequences of *rbcL*, *matK*, and *phyA* genes, with special reference to differentiation of chromosome numbers [J]. Systematic Botany, 31(3): 481-492.
- Perveen A, Qaiser M, 2008. Pollen flora of Pakistan - LX. Aristolochiaceae [J]. Pakistan Journal of Botany, 40(6): 2247-2249.
- Polevova S, 2019. Sporoderm ultrastructure and development in *Aristolochia manshuriensis* Komarov (Aristolochiaceae)[J]. Grana, 58(5): 337-349.
- The Royal Botanic Gardens, Kew, 2026. POWO, Plants of the World Online [DB/OL]. [2026-6-15]. <https://powo.science.kew.org/>.
- Subramanyan J, Bahri S, Bushra, et al., 2023. A scanning electron microscopy study of pollen grains[J]. International Journal of Advanced Research, 11(08): 248-257.
- Wan X Q, Gao C, Song Q L, et al., 2025. Research on pollen morphology and germination characteristics of *Camellia oleifera* 'Changlin' [J]. Guihaia, 45(11): 2056-2066. [万先琴, 高超, 宋启玲, 等, 2025. '长林' 油茶良种花粉形态和花粉萌发特性研究 [J]. 广西植物, 45(11): 2056-2066.]
- Walker J W, 1971. Unique type of angiosperm pollen from the family Annonaceae [J]. Science, 172(3983): 565-567.
- Walker J W, Skvarla J J, 1975. Primitively columellaless pollen: A new concept in the evolutionary morphology of angiosperms [J]. Science, 187(4175): 445-447.
- Wang F X, Qian N F, Zhang Y L, 1995. Pollen morphology of chinese plants [M]. Beijing: Science Press: 1-35.[王伏雄, 钱南芬, 张玉龙, 1995. 中国植物花粉形态 [M]. 北京: 科学出版社: 1-35.]
- Wang K F, Wang X Z, 1983. An introduction to palynology [M]. Beijing: Peking University Press: 59-71. [王开发, 王宪曾, 1983. 孢粉学概论 [M]. 北京: 北京大学出版社: 59-71.]

- Zhang S, Gao S P, Zhang X, et al., 2014. Pollen morphology and its relationship to taxonomy of 13 species in the *Impatiens* (Balsaminaceae) from Ya'an of Sichuan, China [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 34(3): 502-508. [张硕, 高素萍, 张雪, 等, 2014. 四川雅安地区 13 种凤仙花属植物花粉形态及其分类学意义 [J]. *西北植物学报*, 34(3): 502-508.]
- Zhang Y X, Chen Q F, 2002. Study on pollen morphology of six kinds of *buck-wheat* flowers by means of electric microscope [J]. *Guihaia*, 22(3): 232-236. [张玉霞, 陈庆富, 2002. 六个不同类型荞麦花花粉粒形态的电镜观察比较研究 [J]. *广西植物*, 22(3): 232-236.]
- Zhao Y, 2021. Pollen observation of four Fabaceae species under scanning electron microscopy using different drying method [J]. *Journal of Chinese Electron Microscopy Society*, 40(3): 307-310. [赵颖, 2021. 不同制样方法下四种豆科植物花粉的扫描电镜观察 [J]. *电子显微镜学报*, 40(3): 307-310.]
- Zhao Y X, Feng Q, Tian L, et al., 2021. Pollen morphology and numerical taxonomy of 22 *Hibiscus syriacus* [J]. *Guihaia*, 41(1): 103-113. [赵艺璇, 冯琪, 田琳, 等, 2021. 22 个木槿品种花粉形态与分类研究 [J]. *广西植物*, 41(1): 103-113.]
- Zhu X X, Li X Q, Liao S, et al., 2019. Reinstatement of *Isotrema*, a new generic delimitation of *Aristolochia* subgen. *Siphisia* (Aristolochiaceae) [J]. *Phytotaxa*, 401(1): 1-23.
- Zhu X X, Wang J, Liao S, et al., 2019. Synopsis of *Aristolochia* L. and *Isotrema* Raf. (Aristolochiaceae) in China [J]. *Biodiversity Science*, 27(10): 1143—1146. [朱鑫鑫, 王君, 廖帅, 等, 2019. 中国马兜铃属和关木通属 (马兜铃科) 概览 [J]. *生物多样性*, 27(10): 1143-1146.]
- Zhu Y, Song H, Li K, et al., 2025. Pollen morphology of 31 taxa of genus *Iris* (Iridaceae) and its taxonomic implications [J]. *Guihaia*, 45(5): 886-902. [朱莹, 宋华, 李凯, 等, 2025. 鸢尾属 31 个分类群的花粉形态及其分类学意义 [J]. *广西植物*, 45(5): 886-902.]