

DOI: 10.3724/SP.J.1140.2009.03141

孢粉稳定碳同位素研究进展

边叶萍, 翁成郁

(同济大学 海洋地质国家重点实验室, 上海 200092)

摘要: 由于植物的光合作用途径不同, C₃和C₄植物的 $\delta^{13}\text{C}$ 值有明显不同的分布范围, 这可以用来研究环境的变化。花粉的碳同位素分析结果显示其 $\delta^{13}\text{C}$ 值与植物的 $\delta^{13}\text{C}$ 值变化规律一致, 也能很好地反映植物的光合作用途径, 进而间接反映其所处的气候环境条件。相比于植物体, 化石花粉颗粒组成成分较单一, 而其生成时间短, 因而其碳同位素或许能较好地反映植物开花期时的环境条件, 如雨水、大气CO₂等的性质, 为更精确的环境重建提供可能。初步的研究结果也显示花粉的 $\delta^{13}\text{C}$ 值与开花期的温度存在线性关系。高精度结果的取得依赖于实验技术和仪器设备的改进, 研究表明传统孢粉的醋酸酐处理过程中存在碳同位素污染, 采用浓H₂SO₄浸泡可达到相同的去除纤维素的目的而避免污染。另外, 通过对质谱仪的改进——装配旋转镍丝等进样系统(SWiM-IRMS), 使实验所需的测试量大大减少, 对单粒花粉进行测定也已经成为可能, 但实验的精度还待进一步提高。

关键词: 孢粉; 稳定碳同位素; 孢粉学; 孢子花粉素; 古生态

中图分类号: P597

文献标识码: A

文章编号: 0256-1492(2009)03-0141-08

孢粉分析是古环境研究中的一个重要分析手段, 这主要是由于孢子和花粉有几个比较明显的优势: 生产量高、细胞壁易于保存、保存范围广、壁的表面结构易于识别等。它可以提供直接的古植被群落结构信息, 从而推断与其相对应的气候环境及环境变化与人类活动对其分布和演化的影响。但孢粉分析主要是注重形态和分类特征等, 这些方面的研究可以提供植被较为宏观和定性的属性, 但却常常受很多因素的限制, 如孢粉鉴定的分类学水平(大多数只到属或科的水平)、鉴定者对研究地区植被和花粉种类的熟悉程度及鉴定所花费的时间等, 研究者自然想到能否通过对花粉的微观成分等的研究获取其生成时的气候环境参数。但由于受一些组分的保存状态所限(如原生质组分常不能保存)或对组分特征与环境参数的相关性的了解不够等, 这样的研究目前还不多, 但却可能是未来研究的关注点或努力方向之一。

植物光合作用的产物集聚生成了植物的各个组织, 目前人们已经明了由于光合作用途径的不同能够影响植物组分中的由CO₂带来的碳元素的性质(只要是 $\delta^{13}\text{C}$ 值), 这一现象的掌握已在植物生理和生态中得到广泛的应用, 植物组织的 $\delta^{13}\text{C}$ 分析也被

广泛应用于过去环境和生态学的研究^[1-5]。目前已有很多孢粉学研究将孢粉图谱的解释与沉积物中的有机碳的 $\delta^{13}\text{C}$ 记录相结合^[6-9], 从不同的角度来说明C₃和C₄植物的相对含量变化, 或者植被群落结构的演化等, 从而进一步推断得到温度、降水等气候指标。由于孢粉壁中也包含有光合作用生成的碳元素, 因而随着分析技术精度的提高, 孢粉壁中 $\delta^{13}\text{C}$ 研究也成为了孢粉分析和古环境研究中的一种更直接的方法和手段, 且正处于发展和成熟的阶段。

一般认为, 由于植物生长周期较长(尤其是木本植物), 植被对气候环境变化的响应可能存在一个或长或短的滞后效应, 因而可能对一些较短时间内事件来不及显现或表现不明显^[10]。而花粉本身的形成周期较短, 主要是当年光合作用产物形成, 并在当年就散发出, 因而其组成与当年尤其是开花季节的气候参数和营养成分的相关性应该是最大的, 这就能克服或减小传统的孢粉分析在恢复古环境时存在的时间滞后的缺陷, 能够在更高时间精度上反映环境的变化, 尤其是与光合作用直接相关的大气CO₂和降水等变化。但这样做的前提是相关性的建立以及研究手段的掌握。

这一技术的开展时间不长, 本文将对近年来有关孢粉的稳定碳同位素研究的方法、原理和最新进展情况进行回顾, 对其在古环境、古生态、古气候方面应用的各个因素及实际操作中的困难和局限性作一介绍和分析, 并对未来可能的前景做一简单展望。

基金项目: 国家重点基础研究发展规划项目(2007CB815900);
国家自然科学基金项目(40621063, 40771072)

作者简介: 边叶萍(1983—), 女, 博士生, 从事海洋地质学研究。
E-mail: ping981201@163.com

收稿日期: 2009-02-28; 改回日期: 2009-03-21。周立君编辑

1 研究背景

1.1 基本原理

孢粉稳定碳同位素分析的基本原理主要是基于植物在光合作用过程中对大气中 CO₂ 碳同位素的生物分馏作用。植物的光合作用途径有 C₃、C₄ 和 CAM 三种, 前两种较常见。C₃ 和 C₄ 植物中对光合作用起作用的催化酶不同, 中间产物也不一样。它们在 CO₂ 的吸收和光合合成过程中对温度的适应范围、水分的利用率、对 CO₂ 的亲合力及对碳同位素的生物分馏作用也有所不同。总体来说, C₃ 植物更适应于潮湿、低温和高 CO₂ 的环境, 而 C₄ 植物更适应干旱、高温和低 CO₂ 的条件, 因此, 它们在植被中的含量可以反映环境参数的变化。由于对碳同位素的生物分馏作用的不同致使光合作用产物中的碳同位素含量比值不同。一般而言, C₃ 植物的 $\delta^{13}\text{C}$ 值为 $-23\text{\textperthousand} \sim -38\text{\textperthousand}$, 而 C₄ 植物的 $\delta^{13}\text{C}$ 值变化较小, 为 $-12\text{\textperthousand} \sim -14\text{\textperthousand}$ 。这一特性使得利用 $\delta^{13}\text{C}$ 值的测定和判断 C₄ 植物的含量进而推断气候条件的变化成为可能。这一技术已经在植物生理学和生态学中有了广泛应用^[3-4]。

由于 C₄ 植物的生理构造使其比 C₃ 植物更能适应较干旱的以及大气 CO₂ 浓度较低的环境, 从而使得 C₃ 和 C₄ 植物的相对含量会随着环境参数的改变而产生变化, 如温度、湿度以及大气 CO₂ 浓度等。因此, 我们可以将植物组织及各类生物化合物的稳定碳同位素分析应用到生物学、生态学及地质学等领域^[3-4], 比如利用植物化石的 $\delta^{13}\text{C}$ 分析来了解从 C₃ 到 C₄ 植物转变时的环境状态^[7] 以及那些环境参数的变化能引发上述转变过程^[1, 11]。

孢粉颗粒主要包括内部原生质、纤维质内壁和孢子花粉素外壁, 其中外壁有强的抗酸抗氧化性, 化学分析显示孢子花粉素是一种类 β-胡萝卜素, 分子式可以表示为 C₉₀H₁₅₀O₃₃, 是植物光合作用的产物, 能比较完整地保存在地层中, 孢粉的形态和分类分析就是基于外壁的纹饰、萌发孔等特征的。早在 1932 年, Zetzsche 提出孢子花粉素来描述孢粉外壁的有机质组成(含量达到 65% ~ 80%), 而且类似的物质在早期的地地质层中也有所保留, 因此孢粉外壁的分析使我们了解过去的植物生态和生长的环境等。1941 年 Murphey 和 Nier 对 Lycopodium 孢子的孢子花粉素进行稳定碳同位素测试, 发现比大气中的 $\delta^{13}\text{C}$ 值低^[10]。但在将这一方法应用于更广泛

的古环境和古气候分析时, 有必要验证花粉的 $\delta^{13}\text{C}$ 值是否与植物体、植物组织的 $\delta^{13}\text{C}$ 值一致。另外, 除了光合作用途径不同的影响之外, 由于孢粉的生成还受光合作用的反应物水和 CO₂ 性质以及生成时环境条件的影响, 这些因素势必会在孢粉的组分上留下一定的痕迹, 因而也需验证其他环境因素对 $\delta^{13}\text{C}$ 的影响相对于光合作用途径不同的影响是否有实质性的意义。

1.2 孢粉 $\delta^{13}\text{C}$ 值与植物体不同组织的比较

沉积物中的有机碳主要来自于植物, 其同位素可以用于解释植被演化、所处的环境状态及与各生态系统之间的关系, 但由于生理过程和作用的不同, 使得同位素的分馏作用在不同部位的结果会有所不同, 植物的叶子通常比其他部位贫 ^{13}C , 植物蛋白质相对富 ^{13}C , 而脂类化合物贫 ^{13}C 。植物中不同氨基酸的 $\delta^{13}\text{C}$ 值也各不相同^[12-14]。因此我们在将孢粉的同位素分析应用于环境解释前, 需要知道它的同位素变化是否与其他植物组织的一致, 以及在孢粉中的偶然波动是否大于主要环境因子引起的变动。

Amundson 等^[15] 对禾本科植物中不同生态环境下植物的稳定碳同位素进行研究分析, 包括对 C₃ 和 C₄ 植物全样同位素、原始孢粉同位素及化学处理后的孢粉同位素, 发现原始孢粉与其植物体的同位素很接近, 可以认为孢粉的稳定同位素与植物体对环境变化的反应是一致的。但其实验材料只是草地植被, 其结论可能存在局限性。Jahren^[12] 广泛收集了北美地区的 189 种现代被子植物, 包含了被子植物的各个进化分支, 进行了更加详细的分析, 对植物的孢粉、茎干和树叶等部位的同位素的测定和比较并结合前人的部分数据显示, 孢粉的碳同位素变化范围为 $-14.70\text{\textperthousand} \sim -32.34\text{\textperthousand}$, 茎干的变化范围为 $-12.55\text{\textperthousand} \sim -30.82\text{\textperthousand}$, 树叶的变化范围为 $-14.14\text{\textperthousand} \sim -31.75\text{\textperthousand}$, 这些变化范围都在陆生植物的碳同位素变化幅度内^[12, 16]。用孢粉碳同位素和植物其他部分同位素分别作为坐标轴显示, 无论是茎干还是树叶, 或植物体等与孢粉的同位素测定值都在 1:1 线附近(图 1), 这说明孢粉与它们的关系基本上是一致的。对于同一植物样品, 孢粉与植物体全样两者间的 $\delta^{13}\text{C}$ 差值 ($\Delta_{\text{pollen-bulk}}$) 的变化范围从 $-3.93\text{\textperthousand}$ 到 $+5.29\text{\textperthousand}$, 但 90% 以上的值都在 $\pm 3.00\text{\textperthousand}$ 之间。同样, 孢粉与茎干两者的 $\delta^{13}\text{C}$ 差值 ($\Delta_{\text{pollen-stem}}$) 的变化范围从 $-4.01\text{\textperthousand}$ 到 $+5.44\text{\textperthousand}$, 90% 以上的值都在 $\pm 3.00\text{\textperthousand}$ 之间^[12]。

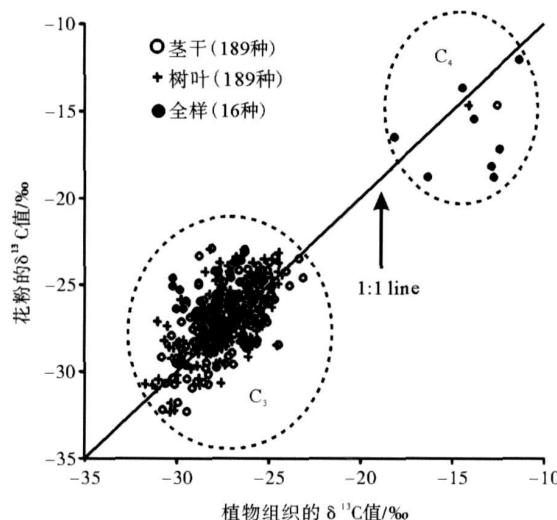


图1 现代 C₃ 和 C₄ 植物的孢粉 $\delta^{13}\text{C}$ 值与同一植物体的茎干、树叶的 $\delta^{13}\text{C}$ 值之间的关系(引自参考文献[12])

Fig. 1 Relationship between $\delta^{13}\text{C}$ values of stem and leaf tissue and that of pollen from 174 species of C₃ plant and from 1 species of C₄ plant (after reference [12])

根据这些植物在进化树上的分枝看, 不同的植物种群都显示出一致的结果。但是由于植物组织所含的组分不同, 结果会有一些不同^[12-14], 比如木质植物茎干与能进行光合作用的植物茎干间的 $\delta^{13}\text{C}$ 值有差异, 一般而言是前者的 $\delta^{13}\text{C}$ 值会比同种植物的树叶和孢粉的 $\delta^{13}\text{C}$ 值偏负, 这主要是由于木质素的 $\delta^{13}\text{C}$ 值偏负(相对植物体会偏负 4.2‰)^[13]。因此, 对植物体的测定结果可能因来源中植物组织和相应的化学组成成分有差异而显得波动较大, 相对地, 孢粉的物质组成较为一致, 其同位素变化相对比较稳定, 或许能更好地体现出环境变化的相关信息。

综上所述, 花粉碳同位素和植物体本身的碳同位素的变化是一致的, 也能反映植物的不同光合作用方式, 但花粉可能由于其物质组成和来源比较单一, 形成过程比较一致, 它的碳同位素值比植物体本身的碳同位素值要稳定, 也许比植物体的其他部分在反映形成过程的环境影响上更具可靠性。再结合孢粉的产量高、传播广、保存好的特点, 花粉碳同位素分析应该比植物体具有更大的优势和可行性。

1.3 孢粉 $\delta^{13}\text{C}$ 值与环境参数间的关系

如前面所述, 对孢粉的 $\delta^{13}\text{C}$ 值影响最大的是植物的光合作用方式。但是这种方式的不同不能解释所有的变化。孢粉的形成时间短, 主要在植物开花期间, 因而可以是探讨环境参数与其 $\delta^{13}\text{C}$ 值的较好的研究材料, 但前提是必须建立一个比较明确的

关于其 $\delta^{13}\text{C}$ 值与气候、环境等的各个参数的数量关系以后才能将地球化学测试应用到实际中。那么, 这种数量关系是否存在? 在不同的植物中这种关系是否稳定一致呢?

Loader 等^[10, 17] 收集了欧洲地区 28 个站位的现代 *Pinus sylvestris* 花粉, 将其稳定碳同位素记录与当地的各种气候指标的观测值进行对比。在收集气象资料时, 由于条件限制, 只有每年 4—6 月的平均气温记录, 但此时正好是孢粉形成和传播的时期。虽然影响 $\delta^{13}\text{C}$ 值变化的因素有很多, 但是大量的研究表明其与夏季温度有显著的相关性^[17], 这主要是研究区夏季水汽压强较高, 湿度较低, 光照较强等状态, 而孢粉的 $\delta^{13}\text{C}$ 值可能反映出孢粉传播前的 4~6 个星期内的生长状况。因此, 孢粉外壁的孢子花粉素中的 $\delta^{13}\text{C}$ 值能很好地记录其形成时的环境指数, 而分析结果也显示了孢粉的 $\delta^{13}\text{C}$ 值与温度的气象记录有很好的线性关系(图 2)。

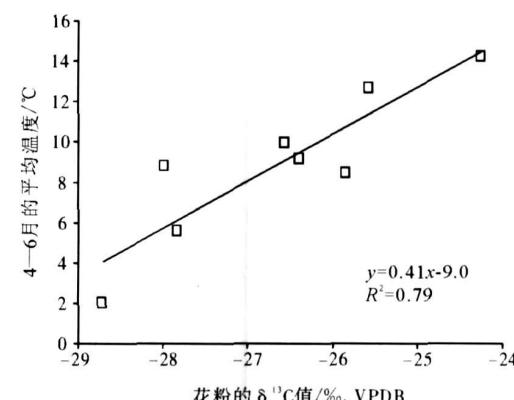


图2 *Pinus sylvestris* 花粉的 $\delta^{13}\text{C}$ 值与当地 4—6 月的平均温度之间的线性关系(引自参考文献[17])

Fig. 2 Relationship between mean April-June temperature and $\delta^{13}\text{C}$ of *Pinus sylvestris* pollen collected from the European spatial study network (after reference [17])

当然, 这一尝试还处于探索性起步阶段, 所得数据还很少, 结论也存在很大的不确定性, 有时甚至是矛盾的。比如, 有研究表明温度与植物的 $\delta^{13}\text{C}$ 值是负相关的^[12, 18-21], 因为随着温度的升高, 蒸发压强也增加, 从而增强气孔的电导率, 影响植物吸收 CO₂ 的过程。这种关系有可能不如想象中的那么简单, 也许和多种环境参数有关, 因此在不同的条件下会显现出矛盾的表现。但是已知结果至少已经为我们提供了一些进一步研究的线索, 也许在未来能够有更深入的认识。

2 孢粉稳定碳同位素测定过程中的若干问题

如上所述, 孢粉稳定碳同位素分析从理论上具有很多优点。但同时也要看到, 由于孢粉粒个体很小, 往往需要通过一系列的化学处理将它们富集和提纯, 这一过程相对于植物体的测定比较繁琐耗时, 同时在操作技术上向我们提出了新的问题, 例如化学提纯的过程是否会影响测量的结果, 如果是, 应该怎么避免? 还有就是分析中需要多少的样品量以及测定时仪器的分辨率是否能够达到要求等问题。

2.1 预处理过程中化学试剂对样品 $\delta^{13}\text{C}$ 值的影响

孢粉颗粒在成岩过程中脂类、纤维素和蛋白质遭到破坏^[22], 在分析前又必须用化学方法去除溶碱性有机质、硅质和碳酸盐, 特别是希望能清除孢粉内

壁、纤维素和细胞质等残质, 只留下由孢子花粉素组成的外壁。常规的化学提纯方法是通过醋酸酐处理法(醋酸酐和浓硫酸的 9:1 混合物), 但是 Amundson 等^[15]发现经过醋酸酐化学分离后的孢粉碳同位素与未经处理的原始孢粉粒的碳同位素存在很大的差异, 这一差异已经对结果有很大的影响(表 1)。究其原因他认为是由于在化学处理过程中产生的碳同位素的污染。原始的孢粉样只是通过离心来增加浓度的, 而化学处理的孢粉样品所采取的是标准孢粉样品处理流程, 包括了 HCl、KOH、HF 和醋酸酐处理等。醋酸酐的 $\delta^{13}\text{C}$ 值为 -19.5\% , 冰醋酸是 $(-20.4 \pm 0.1)\text{\%}$, 这些试剂虽然不会在样品中有太多的残留, 但它们在与孢粉反应时会改变孢粉的碳同位素值^[15, 23]。因此, 这种常规的化学处理方法可能不适合碳同位素分析的前期处理, 应该寻求一种新的处理方法, 使得处理过程既能完全清除纤维素, 但又不会对样品的碳同位素有影响。

表 1 花粉粒、不同化学处理方法得到的孢子花粉素的 $\delta^{13}\text{C}$ 值以及两者之间的差值

Table 1 Literature data on $\delta^{13}\text{C}$ values for whole pollen grains, sporopollenin and calculated Δ
obtained after different chemical treatments on various pollen species

种类	整粒花粉	孢子花粉	前两者的差值	处理方法	参考文献
	$\delta^{13}\text{C}/\text{\%}$	$\delta^{13}\text{C}/\text{\%}$	$\Delta/\text{\%}$		
<i>Zea mays</i> C ₄	-10.45	-18.44	-7.99	醋酸酐	[1]
<i>Populus tricocarpa</i> C ₃	-23.97	-33.27	-9.3	醋酸酐	[1]
<i>Sorghum vulgare</i> C ₄	-10.02	-14.6	-4.58	改进的醋酸酐	[25]
<i>Platanus</i> sp. C ₃	-23.16	-25.04	-1.88	改进的醋酸酐	[25]
<i>Zea mays</i> C ₄	-12.1	-14.4	-2.3	KOH+醋酸酐	[15]
<i>Orcuttia californica</i> C ₄	-15.3	-23	-7.7	KOH+醋酸酐	[15]
<i>Pennisetum clandestinum</i> C ₄	-18.2	-28.8	-10.6	KOH+醋酸酐	[15]
<i>Lolium multiflorum</i> C ₃	-25.1	-27.5	-2.4	KOH+醋酸酐	[15]
<i>Zea mays</i> C ₄	-10.45	-12.26	-1.81	H ₂ SO ₄	[1]
<i>Populus tricocarpa</i> C ₃	-23.97	-27.52	-3.55	H ₂ SO ₄	[1]
<i>Pinus sylvestris</i> C ₃	-27.39	-29.57	-2.18	H ₂ SO ₄	[1]
<i>Sorghum vulgare</i> C ₄	-10.02	-11.2	-1.18	H ₂ SO ₄	[25]
<i>Platanus</i> sp. C ₃	-23.16	-24.07	-0.91	H ₂ SO ₄	[25]
<i>Cedrus deodara</i> C ₃	-27	-26.21	0.79	NaOH	[12]
<i>Pinus coulteri</i> C ₃	-29.4	-28.18	1.22	NaOH	[12]
<i>Cedrus deodara</i> C ₃	-27	-27.15	-0.15	H ₂ O ₂	[12]
<i>Pinus coulteri</i> C ₃	-29.4	-29.57	-0.17	H ₂ O ₂	[12]
<i>Cedrus deodara</i> C ₃	-27	-27.11	-0.11	HF+HCl+Schulze 溶液	[12]
<i>Pinus coulteri</i> C ₃	-29.4	-29.44	-0.04	HF+HCl+Schulze 溶液	[12]
<i>Agropyron repens</i> C ₃	-24.1	-27.1	-3.0	HCl+KOH+HF+H ₂ SO ₄	[26]
<i>Bromus inermis</i> C ₃	-24.5	-25.5	-1.4	HCl+KOH+HF+H ₂ SO ₄	[26]
<i>Sorghum halapense</i> C ₄	-11.4	-12.6	-1.2	HCl+KOH+HF+H ₂ SO ₄	[26]
<i>Sorghum vulgare</i> C ₄	-9.2	-12.9	-3.7	HCl+KOH+HF+H ₂ SO ₄	[26]

在 Amundson 等(1997)的实验基础上, 为了避免碳同位素污染, Loade 和 Hemming (2000)采取了一种简单实用的孢粉富集方法, 将 10 mg 经过筛选的干孢粉放入试管中, 加入 10 mL 浓硫酸, 然后在室温下用磁力搅拌仪搅拌、离心和清洗后, 上机测定碳同位素^[24]。发现处理时间在半个小时以上的样品的同位素没有明显的变化, 说明此时纤维素已完全反应, 这样就可以在不使用醋酸酐的情况下达到我们想要的结果(图 3)。

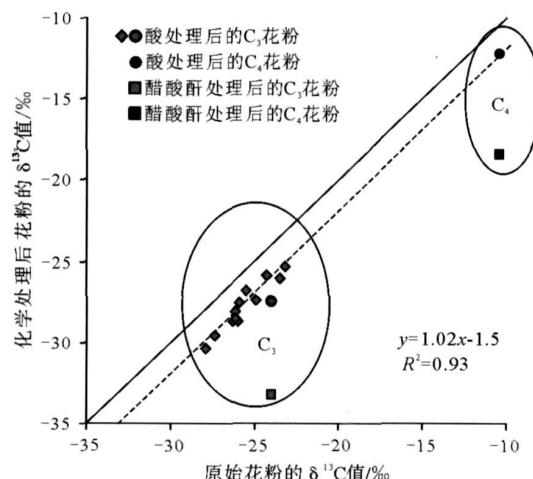


图 3 原始的孢粉碳同位素与酸处理后的孢粉
 $\delta^{13}\text{C}$ 值对比(修改自参考文献[10])

Fig. 3 Comparison of $\delta^{13}\text{C}$ composition between primary and acid treated pollens(modified from reference[10])

随后, 又有一些学者通过孢粉处理过程中比较常用的化学试剂, 希望能达到同样的或更好的实验效果。Descolas-Gros 和 Scholzel^[25] 收集整理了不同化学处理方法对实验结果的影响, 可以明显看到, 使用过醋酸酐处理的样品, 其 $\delta^{13}\text{C}$ 值会偏负 5‰ 至 10‰, 利用 H_2SO_4 的处理方法去除纤维素的结果比较理想, 且与未经处理的孢粉粒之间的差值最小(表 1)。另外 Jahren^[12] 通过实验得到使用 NaOH 会使 $\delta^{13}\text{C}$ 值偏正, 而利用组合 $\text{HF} + \text{HCl} + \text{Schulze}$ 溶液(70% 的 HNO_3 和饱和的 KClO_3 溶液按 1: 1 配制而成, 该方法主要用于第四纪之前的孢粉样品处理)得到的结果比较好, 但是由于其测试的是乔木花粉, 而不是草地植被, 因此, 我们不能就此肯定 H_2SO_4 和 Schulze 溶液哪个的效果更好。

2.2 测试量的改进

花粉个体微小, 所含碳元素量不高, 而从地层中能提取的花粉量也很少, 且提取过程需要投入较多

的时间和工作量, 因而测试时要求的样品量和精度是很关键的。目前, 高分辨的测试很大一部分是得益于测试技术的提高, 包括实验过程的改进和仪器设备精度的改进, 而且现在有机地球化学的测试量级都在毫克级, 甚至更低, 从而为孢粉的稳定同位素测试提供了可能性。

一般而言, 在进入质谱仪测试 $\delta^{13}\text{C}$ 值前, 样品需要移入经过称量的锡杯中, 将锡杯包好后放进进样系统, 然后测试经燃烧后得到的气体中的 $\delta^{13}\text{C}$ 值。而孢粉测试比较常用的也是将提纯的孢粉粒放入锡杯中, 等水分蒸发后进入 EA-IRMS 测试的^[12, 26]。

孢粉样品一般先在显微镜下进行提纯, 而不是像其他样品经过预处理后直接上机测试。通过显微操作, 一个小时大概能提取现代花粉 600 粒, 或化石花粉 60 粒^[26]。同时, 为了保证测试结果的正确性, 至少需要未经过化学处理的现代花粉 200 粒, 或经过化学处理的花粉 600 粒才能得到比较好的实验结果^[26]。对于测定 C₃、C₄ 植物的比例, 可以将富集后的所有的孢粉作为一个样品进行分析, 再根据测出的数据推断 C₃、C₄ 的比例。Nelson 等^[27] 经过一系列的重复测试发现, 当测试量达到 50 粒花粉时就能观察到比较明显的 C₄ 植物百分含量, 但当测试量增加到 100 粒甚至 150 粒时, 其结果就会更加理想(图 4)。对于实验误差来说, 当测试样品中 C₄ 花粉含量适中时, 结果的正确率会比较高, 而当其含量居两端时, 误差较大(图 4)。比如, 当测试的样品是含 20% C₄ 花粉的 100 粒花粉, 若认为实验结果与真实值的差值范围在 10% 以内为正确, 实验结果的正确率高于 1σ 内的 68% (实为约 89%), 但若只要求差值范围在 12.5% 内为正确, 那么正确率高于 95% (2σ) (图 4)。因此, 上述测试的结果选择 95% 的置信度时, 实验测得的 C₄ 的百分含量范围是 7.5% ~ 32.5%。图 4 的结果显示测试量在 50 粒花粉以上时, 正确率基本都在 68% 以上, 但是考虑到在样品的传输过程中, 会有大约 48% 的花粉粒会从镍线上脱落, 因此, 实际操作中至少需要 90 粒以上的化石孢粉颗粒(图 4), 而这比上述的 600 粒已是一个很大的进步, 明显提高了孢粉 $\delta^{13}\text{C}$ 分析的效率。虽然测试量上有很大的改进, 但是实验的误差都在 10% 以上, 尤其是当 C₄ 植物百分含量居两端, 即 < 30% 或 > 60% 时, 实验误差会使结果难有确切的结论。

鉴于花粉分辨率较低, 有时需要对单粒花粉中的碳同位素进行测量, 就需要知道某些花粉种类的光合作用性质(尤其是禾本科花粉)。对于利用花

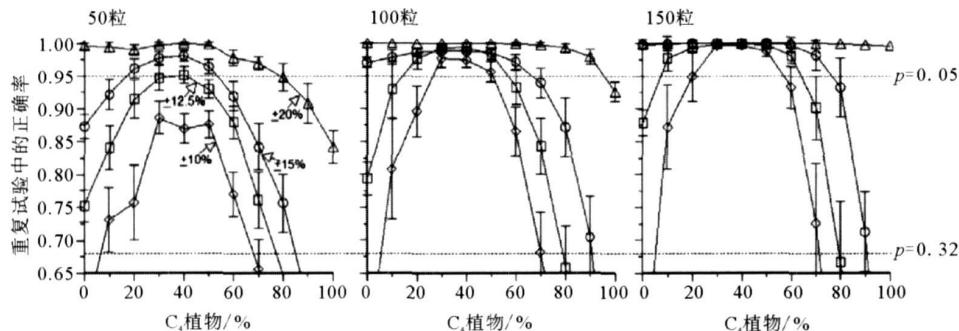


图 4 对已知 C_4 植物百分含量的样品进行重复试验所得的正确率((具体的实验条件见参考文献[27])
测试量分别包括 50、100、150 粒花粉; 图中符号代表测定误差: 其中菱形为 $\pm 10\%$, 正方形为 $\pm 12.5\%$, 圆形为 $\pm 15\%$,
三角形为 $\pm 20\%$; 两条虚线分别代表了 1σ (68%) 和 2σ (95%) 的置信区间(引自参考文献[27]))

Fig. 4 Proportion of randomized trials in which C_4 pollen abundance of a sample dataset was correctly identified
Each dataset contained 50, 100, or 150 grains randomly selected from the master dataset, as described in Nelson, 2007.

The accuracy of estimated C_4 abundance in relation to the true C_4 proportion of each dataset is shown with
different symbols, diamonds, squares, circles and triangles represent accuracy of 10%, 12.5%, 15%, and 20%,
respectively. Lines for 1 σ and 2 σ confidence limits of the classifications are shown(after reference[27]).

粉的碳同位素建立气候参数的变化情况, 也需要精确到单粒花粉的精度, 这时一定需要完全排除由于 C_3 、 C_4 途径不同造成的影响。这时最好是对鉴定准确而其光合作用途径清楚的花粉种类进行测定, 最好能够出自同种植物(如某种花粉类型在研究地区仅有一种植物), 这样可排除种间可能存在的差异造成的影响。这样的花粉常常在每一个样品中都不多, 测量的精度也成为关键。Nelson 等^[27] 所用的方法是将样品移入经高温(850°C)清洗的镍线上, 然后该镍线会以 0.8 cm/s 的速度先后通过烘干炉(120°C)和燃烧炉(800°C), 最后, 燃烧得到的气体在去除水蒸汽后会进入质谱仪中进行稳定碳同位素测定, 这样的方法已经可以对单粒花粉进行分析, 但目前技术水平的误差还比较大, 这都是未来研究中需要改进和提高的。

3 结论与展望

孢粉的稳定碳同位素分析在环境、气候和生态方面的应用虽然主要是近十年来才开始的, 但其前景正受到学者们的关注。近年来该领域的研究工作有增多的趋势, 总结这些年的成果, 主要有以下几点认识:

孢粉粒与植物体全样或植物组织的组成成分存在一些差异, 但它们之间的 $\delta^{13}\text{C}$ 值基本一致, 因此, 孢粉粒所测得的 $\delta^{13}\text{C}$ 值能代替植物体用于测定植物的光合作用途径(C_3 和 C_4), 而且由于孢粉颗粒的化学组成比较一致, 形成时间较短, 甚至可能更精确

地反映出植物群落以及环境的变化特征, 这一特性或许能为更高精度的气候孢粉同位素关系的建立提供理论基础; 目前的孢粉 $\delta^{13}\text{C}$ 值与气候参数间的关系的研究还处于尝试时期, 虽然已有的研究结果显示了它们之间存在着线性关系, 但更深入更全面的研究还亟待进一步的工作和理论突破, 从而为这一领域的研究提供广泛的应用空间。

另一方面的成果来自于实验方法和测试技术的改进。目前已知常用的醋酸酐处理方法会对样品产生碳同位素污染, 新的没有污染的酸处理方法, 如用浓硫酸处理, 已被用于替代传统方法。但这些方法也多是出于尝试期, 还远不能说是完美成熟的, 在未来也许会提出更成熟可靠的方法; 同时, 样品测试的进样系统也得到了改进, 使得测试量大幅度降低, 从而提高分析效率, 提升了该分析方法的应用空间, 然而其测试的精确度对于高分辨率的分析要求来说还是有些不足。

同时, 我们还注意到, 到目前为止的研究主要涉及的是草地植被和温带植被, 这可能与大部分的 C_4 植物为草本植物有关, 而缺少对热带植被的研究。热带植被的种类比较复杂多样, 特别是热带雨林地区的生物多样性是地球上任何地方都无法比拟的, 因此, 如果我们能对现代热带植被的花粉进行类似的分析测试, 这样不但能更好地了解不同地区孢粉的 $\delta^{13}\text{C}$ 值与气候参数间的关系, 而且能改善目前热带植被形态研究结果。另外, 在比较全面的现代数据的基础上, 我们可以提取沉积物中孢粉颗粒, 得到长时间序列, 比较精确的植被演化及古气候信息。

此外, 对海洋表层沉积中的花粉粒进行稳定同位素分析, 或许能结合花粉线对花粉来源、传播途径等方面有更进一步的了解, 从而在结合花粉图谱的基础上, 能更正确地解释海陆记录中的古环境、古生态记录。

参考文献(References)

- [1] Boom A, Marchant R, Hooghiemstra H, et al. CO₂- and temperature-controlled altitudinal shifts of C₄- and C₃-dominated grasslands allow reconstruction of palaeoatmospheric *p*CO₂ [J]. *Palaeogeogr. Palaeoclimat. Palaeoecol.*, 2002, 177: 151-168.
- [2] Francey R, Farquhar G. An explanation of ¹³C/¹²C variations in tree rings[J]. *Nature*, 1982, 297: 28-31.
- [3] Leavitt S, Long A. Evidence for ¹³C/¹²C fractionation between tree leaves and wood[J]. *Nature*, 1982, 298: 742-744.
- [4] Meyers P. Organic geochemical proxies of paleoceanographic paleolimnology and paleoclimatic processes[J]. *Organic Geochemistry*, 1997, 27: 213-250.
- [5] Meyers P. Applications of organic geochemistry to paleolimnological reconstructions: a summary of examples from the Laurentian Great Lakes[J]. *Organic Geochemistry*, 2003, 34: 261-289.
- [6] Street-Perrot F, Huang Y, Perrott R, et al. Impact of lower atmospheric carbon dioxide on tropical mountain ecosystems [J]. *Science*, 1997, 278: 1422-1426.
- [7] Scott L. Grassland development under glacial and interglacial conditions in southern Africa: review of pollen, phytolith and isotope evidence[J]. *Palaeogeogr. Palaeoclimat. Palaeoecol.*, 2002, 177: 47-57.
- [8] Huang Y, Street-Perrot F, Metcalfe S. Climate change as the dominant control on glacial-interglacial variations in C₃ and C₄ plant abundance[J]. *Science*, 2001, 293: 1647-1651.
- [9] van der Kaars S. A Late Quaternary palaeoecological record from the Banda Sea, Indonesia: patterns of vegetation, climate and biomass burning in Indonesia and northern Australia[J]. *Palaeogeogr. Palaeoclimat. Palaeoecol.*, 2000, 155: 135-153.
- [10] Loader N, Hemming D. The stable isotope analysis of pollen as an indicator of terrestrial palaeoenvironmental change: a review of progress and recent developments[J]. *Quat. Sci. Rev.*, 2004, 23: 893-900.
- [11] Nordt L, Boutton T, Jacob J, et al. C₄ plant productivity and climate CO₂ variations in south-central Texas during the late Quaternary[J]. *Quat. Res.*, 2002, 58: 182-188.
- [12] Jahren A. The carbon stable isotope composition of pollen [J]. *Rev. Palaeobot. Palynol.*, 2004, 132: 291-313.
- [13] Benner R, Fogel M, Sprague E, et al. Depletion of ¹³C in lignin and its implication for stable carbon isotope studies[J]. *Nature*, 1987, 329: 708-710.
- [14] Lockheart M, van Bergen P, Evershed R. Variations in the stable carbon isotope compositions of individual lipids from the leaves of modern angiosperms: implications for the study of higher land plant-derived sedimentary organic matter[J]. *Organic Geochemistry*, 1997, 26: 137-153.
- [15] Amundson R, Evett R, Jahren A, et al. Stable carbon isotope composition of Poaceae pollen and its potential in paleovegetational reconstructions[J]. *Rev. Palaeobot. Palynol.*, 1997, 99: 17-24.
- [16] Smith B, Epstein S. Two categories of ¹³C/¹²C ratios for higher plants[J]. *Plant Physiology*, 1971, 47: 380-384.
- [17] Loader N, Hemming D. Spatial variation in pollen δ¹³C correlates with temperature and seasonal development timing [J]. *Holocene*, 2001, 11: 587-592.
- [18] Bowman W, Hubick K, von Caemmerer S, et al. Short term changes in leaf carbon isotope discrimination in salt and water-stressed C₄ grasses[J]. *Plant Physiology*, 1989, 90: 162-166.
- [19] Brugnoli E, Hubick K, von Caemmerer S, et al. Correlation between the carbon isotope discrimination in leaf starch and sugars of C₃ plants and the ratio of intercellular and atmospheric partial pressures of carbon dioxide[J]. *Plant Physiology*, 1988, 88: 1418-1424.
- [20] Marano B, McElroy M. Isotopic composition of atmospheric CO₂ inferred from carbon in C₄ plant cellulose[J]. *Nature*, 1991, 349: 127-131.
- [21] O'Leary M. Carbon isotopes in photosynthesis[J]. *Bio-Science*, 1988, 38: 328-336.
- [22] Van Bergen P, Poole I. Stable carbon isotopes of wood: a clue to palaeoclimate[J]. *Palaeogeogr. Palaeoclimat. Palaeoecol.*, 2002, 182: 31-45.
- [23] Charman D. The effects of acetylation on fossil *Pinus* pollen and *Sphagnum* spores discovered during routine pollen analysis[J]. *Rev. Palaeobot. Palynol.*, 1992, 72: 159-164.
- [24] Loader N, Hemming D. Preparation of pollen for stable carbon isotope analyses[J]. *Chemical Geology*, 2000, 165: 339-344.
- [25] Descolas-Gros C, Scholzel C. Stable isotope ratios of carbon and nitrogen in pollen grains in order to characterize plant functional groups and photosynthetic pathway types[J]. *New Phytologist*, 2007, 176: 390-401.
- [26] Nelson D, Hu F, Michener R. Stable carbon isotope composition of Poaceae pollen: an assessment for reconstructing C₃ and C₄ grass abundance[J]. *The Holocene*, 2006, 16: 819-825.
- [27] Nelson D, Hu F, Mikucki J, et al. Carbon isotopic analysis of individual pollen grains from C₃ and C₄ grasses using a spooling-wire microcombustion interface[J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2007, 71: 4005-4014.

AN OVERVIEW OF CARBON STABLE ISOTOPE ANALYSIS OF POLLEN

BIAN Yeping, WENG Chengyu

(State Key Laboratory of Marine Geology, Tongji University, Shanghai 200092, China)

Abstract: Different in photosynthetic ways, plants have their C₃ and C₄ distinct in ranges of $\delta^{13}\text{C}$ values, which may be used to indicate modern or ancient environmental and ecological conditions. The measured $\delta^{13}\text{C}$ values from modern pollen grains show that they are consistent with the values from other tissues of the plants, and therefore may also indicate the photosynthetic pathways and the climatic conditions of the plants. Compared to the plant tissues, chemical compositions of pollen grains are less variable and are formed in a relatively short period, which means they may have higher temporal resolution in reflecting climatic conditions and features of rain-water and CO₂ during the blooming period. The preliminary research shows that the pollen $\delta^{13}\text{C}$ value is nearly linear with the mean temperature of the flowering time. However, more exploring work is needed to confirm this conclusion. More precise reconstruction based on pollen $\delta^{13}\text{C}$ value also relies on improved experimental technology because some conditional methods may not be applied. Some research has shown that the acetylation methods of pollen preparation may introduce contamination of carbon isotope. A substitution method is the non-carbon containing acid extraction technique to isolate sporopollenin. A spooling-wire microcombustion device interfaced with an isotope-ratio mass spectrometer (SWiM-IRMS) may allow the analysis of $\delta^{13}\text{C}$ from a single pollen grain, although the error range is still large.

Key word: pollen; carbon stable isotope; palynology; sporopollenin; palaeoecology

错误更正:

2009年第2期文章《鄂霍次克海南部晚第四纪的古海洋学记录》一文的图1(鄂霍次克海南部柱状样T00孔其他站位的位置)中出现两个T00站位点,应以右侧的站位点(即49°29'51"N、150°00'36"E)为准,特此更正。