

# 一种用于食草动物粪便显微组织分析的临时装片新技术

曹伊凡 苏建平\*

(中国科学院西北高原生物研究所, 西宁, 810001)

**摘要:** 粪便显微组织分析法是研究食草动物食性的主要方法, 其常规装片技术需要使用 Hoyer's 装片介质对植物碎片进行封片, 而 Hoyer's 封片液的粘性易导致植物碎片在装片过程中发生卷曲和重叠, 影响植物碎片的识别效果。本文提出的新装片技术采用没有粘性的饱和 NaCl 溶液代替 Hoyer's 装片介质, 结合特定的定量取样方法和装片程序, 可以有效地减少植物碎片的卷曲率和重叠率。对比试验显示, 新装片技术可使植物碎片卷曲率从 10.4% 下降至 3.8%, 重叠率从 25% 下降至 8.1%, 说明新装片技术在减少植物碎片卷曲和重叠方面明显优于常规装片方法。

**关键词:** 食草动物食性; 显微组织分析; 植物碎片; 装片技术

**中图分类号:** Q336

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1000 - 1050 (2006) 04 - 0407 - 04

## A new technique for temporary slide mounting in microhistological herbivore fecal analysis

CAO Yifan, SU Jianping\*

(Northwest Institute of Plateau Biology, the Chinese Academy of Sciences, Xining, 810001, China)

**Abstract:** Microhistological fecal analysis is an important technique for investigating herbivore diets. The conventional mounting technique uses Hoyer's mounting medium to seal the plant fragment to the slide. However, Hoyer's seal liquid inevitably causes plant fragments to crinkle and overlap during the mounting process because of the liquid's stickiness, which leads to a poor identification of sample plant fragments. To reduce this problem, we developed a new mounting technique to replace Hoyer's mounting medium: non-viscous saturated NaCl. We performed a controlled experiment in which ten slides of the same feces sample were made and observed, using new and the conventional mounting technique. The percentage of crinkled fragments declined from 10.4% (conventional mounting technique) to 3.8% (new mounting technique) and of overlapping fragments from 25% (conventional mounting technique) to 8.1% (new mounting technique). We recommend the new mounting technique over the conventional mounting technique.

**Key words:** Herbivore diet; Microhistological analysis; Mounting slide techniques; Plant fragment

动物食性研究是一项基础生态学研究, 食性分析是研究动物生境需求的核心内容, 它可以对栖息地评价、容纳量估计、能量代谢以及种间关系提供有价值的基础资料, 同时也为动物尤其是濒危动物的异地保护、人工养殖和资源管理提供理论依据 (郑荣泉和鲍毅新, 2004)。

粪便显微分析法是食草动物食性研究中的常规方法 (Hansen *et al.*, 1973; Hansen, 1974; 陈化鹏和萧前柱, 1989; Alipauo *et al.*, 1992; Sandoval *et al.*, 2005; Mellado *et al.*, 2005; Arceo *et al.*,

2005; Guo and Zhang, 2005)。该法以其易于取样和对动物干扰小的优点, 在食草动物食性研究中得到广泛应用, 也是唯一被用来确定珍稀和濒危动物食性的技术 (Putman, 1984)。它的基本原理是根据粪便中未被消化的植物角质表皮碎片的细胞结构, 鉴定动物取食种类。而该技术的难点之一是植物碎片的识别, 尤其是残留于粪便的植物碎片识别 (Holechek, 1982)。因此, 自 Baumgartner 和 Martin (1939) 提出粪便显微组织分析法以来, 后来的应用过程中就如何提高植物碎片的识别率问题作

基金项目: 青海省重大科技攻关项目 (2002-N-105); 中国科学院知识创新工程领域前沿项目 (CXLY-2002-3)

作者简介: 曹伊凡 (1965 - ), 男, 助研, 主要从事保护生物学研究。

收稿日期: 2006 - 01 - 09; 修回日期: 2006 - 04 - 24

通讯作者, correspondence author, E-mail: jpsu@nwipb.ac.cn

了很多改进 (Dusi, 1949; Storr, 1961; Stewart, 1967; Sparks and Malechek, 1968; Williams, 1969; Hansen, 1981; Holechek, 1982; Barker, 1986; Norbury, 1988; Alipauo *et al.*, 1992), 形成了目前实验室大多采用的 Sparks和 Malechek (1969) 方法。然而, 由于该方法在装片过程中使用了高粘度的 Hoyer's 装片介质, 致使植物碎片很难均匀分开, 并常发生卷曲和重叠, 从而影响了植物碎片的识别。迄今为止, 尚无解决这一问题的报道, 根据我们多年的探索和研究, 建立了一种能显著减少植物碎片卷曲率和重叠率的新装片方法, 现介绍如下。

## 1 试验方法

### 1.1 试剂和材料

医用白凡士林; 次氯酸钠 (有效氯含量不低于 5.2%); 网筛 20 目, 60 目, 100 目, 200 目; 载玻片 25.4 mm × 76.2 mm, 厚 1 ~ 1.2 mm; 盖玻片 24 mm × 24 mm, 厚 0.13 ~ 0.17 mm; 定量取样有机玻璃板 1 块, 25.4 mm × 76.2 mm × 1 mm, 在中央钻取直径 3 mm 的圆孔。长 100 mm 直径为 1 mm 的铁丝做成边长为 20 mm 正方形框, 多余的 20 mm 向上弯曲成为手柄。10 mm × 15 mm × 30 mm 磁铁 1 块。

### 1.2 待检植物碎片制备

藏羚羊 (*Pantholops hodgsoni*) 的夏季新鲜粪便 60 烘干 24 h, 取粪便 2 g 经粉碎机粉碎, 将粉碎的材料依次经 20 目 60 目 100 目网筛筛选, 使碎片大小介于 0.15 mm 和 0.30 mm 之间。取 100

目的筛上物经自来水冲洗约 2 min, 移入平皿, 加入次氯酸钠并用解剖针搅拌, 3 h 后倒入 200 目的网筛中自来水冲洗 3 min, 去除漂白液后待检。

### 1.3 定量取样

取一干净的载玻片, 将事先做好的定量取样有机玻璃板重叠其上, 再取足量待检植物碎片材料填入其圆孔, 然后用解剖针刮除高出圆孔上表面的碎片, 去除有机玻璃板。这样, 可以保证制作的每张切片的植物碎片量基本一致, 避免因样品量悬殊导致的观测结果误差 (Hansen, 1981)。

### 1.4 加制凡士林框

将上述已加载样品的载玻片置于用纸包裹 (避免磁铁划伤载玻片) 好的磁铁上, 再取已制作好的方形铁丝框置于该载玻片上, 用毛细管吸取经水浴加热溶化的凡士林液滴于铁丝框的外部周围, 待凡士林凝固后取下铁丝框使其在载玻片上形成一个 22 mm × 22 mm × 1 mm 的方形框。

### 1.5 滴加饱和 NaCl 溶液

在上述凡士林方框内加入约 0.5 ml 的饱和 NaCl 溶液, 并用解剖针搅拌碎片至碎片完全散开, 加盖玻片, 将溢出的液体用滤纸吸除。即可在显微镜下观察。

## 2 新装片方法与常规方法的结果比较

采用相同的植物碎片待检材料, 按常规装片方法 (Sparks and Malechek, 1969) 和新装片程序分别制作 10 张切片, 利用 DMBS - 223 IPL - 5 数码生物显微镜在 20 倍物镜下观察, 并记录植物碎片总数、卷曲碎片数和重叠碎片数, 结果见表 1。

表 1 两种装片方法的植物碎片卷曲和重叠统计数据

Table 1 Statistics for crinkling and overlapping plant fragments using two different mounting techniques

		常规方法 Conventional mounting technique (Sparks and Malechek, 1969)							
切片 Slides	TF	TC	TCP	OL2	OL3	OL4	OL5	TOL	TOLP
C01	868	67	7.7	40	144	112	10	306	35.3
C02	986	89	9.0	32	153	48	15	248	25.2
C03	980	80	8.2	44	114	44	10	212	21.6
C04	1069	117	10.9	36	192	64	15	307	28.7
C05	1115	137	12.3	64	183	84	15	346	31.0
C06	1204	150	12.5	44	114	92	20	270	22.4
C07	1108	130	11.7	40	114	32	20	206	18.6
C08	1024	111	10.8	40	66	40	10	156	15.2
C09	998	110	11.0	68	105	72	15	260	26.1
C10	993	95	9.6	42	144	60	15	261	26.3
Mean	1035	109	10.4	45	133	65	15	257	25.0
SD	88	25	1.6	11	36	24	4	53	5.6
		本文新装片方法 New mounting techniques							
切片 Slides	TF	TC	TCP	OL2	OL3	OL4	OL5	TOL	TOLP
N01	984	39	4.0	36	30	24	0	90	9.2

续表 1 Continued fom table 1

N02	961	44	4.6	24	30	16	0	70	7.3
N03	989	41	4.2	20	33	20	0	73	7.4
N04	1145	41	3.6	34	36	44	0	114	10.0
N05	964	35	3.6	32	42	28	0	102	10.6
N06	1065	41	3.9	30	36	28	0	94	8.8
N07	1028	44	4.3	16	24	24	0	64	6.2
N08	1137	39	3.4	26	24	16	0	66	5.8
N09	950	34	3.6	24	24	24	0	72	7.6
N10	1225	42	3.4	32	30	44	0	106	8.7
Mean	1045	40	3.8	27	31	27	0	85	8.1
SD	90	3	0.4	6	6	9	0	17	1.5

TF: 植物碎片总数量; TC: 总卷曲碎片数; TCP: 总卷曲率; OL2: 2-碎片重叠数; OL3: 3-碎片重叠数; OL4: 4-碎片重叠数; OL5: 5-碎片重叠数; TOL, 总重叠碎片数 = OL2 + OL3 + OL4 + OL5; TOLP: 重叠率 = TOL ×100/TF

TF: Total number of plant fragments; TC: total number of crinkled fragments; TCP: percent of crinkled fragments = TC ×100/TF; OL2: Number of overlapping fragments in 2 - fragment clusters; OL3: Number of overlapping fragments in 3 - fragment clusters; OL4: Number of overlapping fragments in 4 - fragment clusters; OL5: Number of overlapping fragments in 5 - fragment clusters; TOL: Total number of overlapping fragments = OL2 + OL3 + OL4 + OL5; TOLP: percent of overlapping fragments = TOL ×100/TF.

由于采用了相同的定量取样技术, 表 1 中两种装片方法所得植物碎片总数非常接近, 所以两种装片方法所得植物碎片卷曲和重叠的统计结果具有可比性。表 1 显示, 采用常规装片方法得到的切片大约有 10.4% 的植物碎片发生卷曲, 同时有 25% 的植物碎片发生重叠, 而采用本文提出的新装片方法可使植物碎片卷曲率和重叠率分别下降至 3.8% 和

8.1%, 经 Mann-Whitney 检验, 两种装片方法的植物碎片卷曲率和重叠率差异均达到极显著水平 ( $P < 0.01$ ), 表明本文提出的装片方法在减少植物碎片卷曲和重叠方面明显优于常规方法 (图 1), 并因此增加可鉴别植物碎片的比例, 有利于提高植物碎片的可识别率。

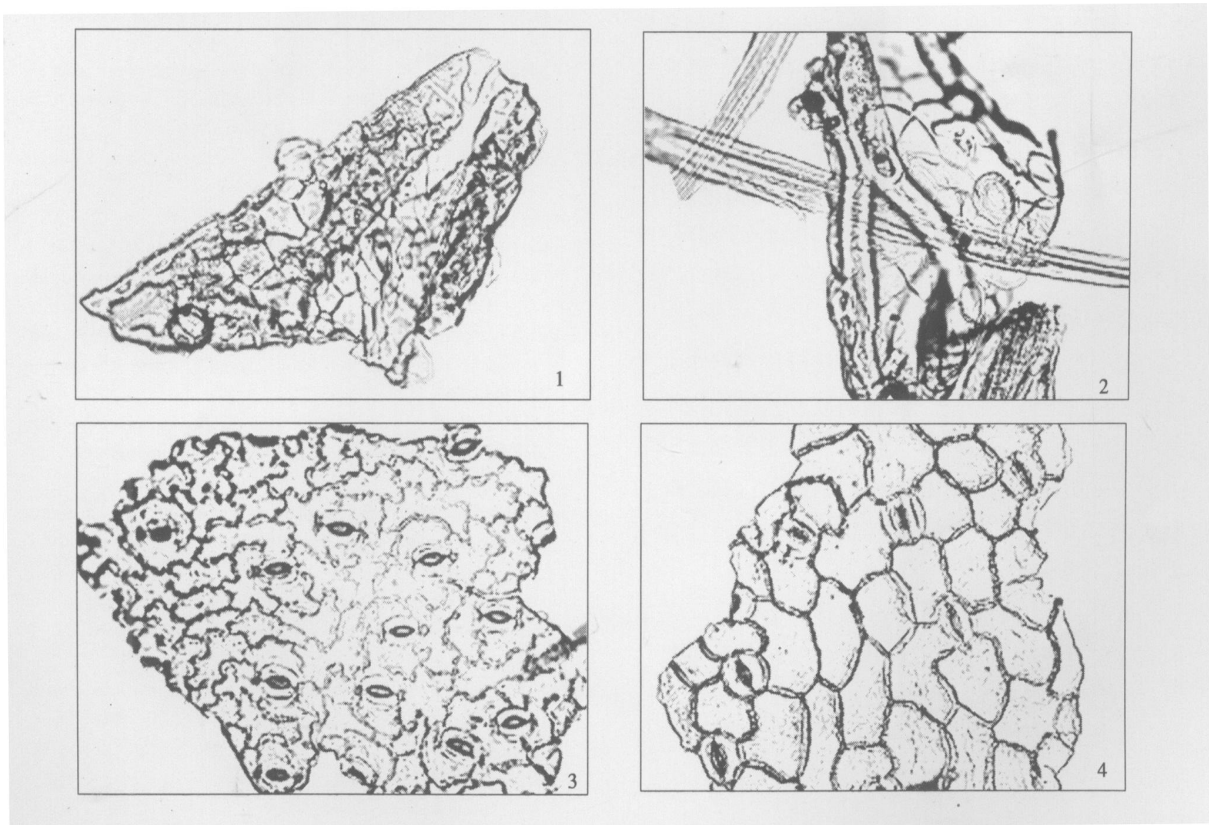


图 1 不同装片法植物碎片的识别效果: 1: 卷曲碎片 (常规装片法); 2: 多个碎片重叠 (常规装片法); 3-4: 清晰的形态结构 (新装片法)

Fig. 1 Illustration of plant fragments by mounted on slides by two different techniques: 1: crinkled fragment (conventional mounting slide techniques); 2: overlapping fragments (conventional mounting slide techniques); 3 - 4: fragments with clear morphological structure (new mounting slide techniques)

### 3 讨论

上述对比试验结果说明, 本文提出的新装片方法能够有效地减少植物碎片的卷曲和重叠, 但这还不是一个符合逻辑的证明, 除非能够对此给出一个合理的解释。

众所周知, 常规装片方法要使用 Hoyer's 装片介质 (Hansen, 1981; Alipauo *et al.*, 1992; Sandoval *et al.*, 2005; Mellado *et al.*, 2005; Arceo *et al.*, 2005), 尽管操作者可以借助解剖针等工具使植物碎片尽可能均匀地在装片介质中散布开来, 但由于装片介质本身具有很高的粘性, 所以在装片过程中容易导致植物碎片卷曲和因相互粘连、不易分离而发生重叠。

本文采用没有粘性的饱和 NaCl 溶液为装片介质, 经解剖针充分搅拌后, 植物碎片可以更加充分地舒展开来, 并随机地分布于溶液之中, 从而能够有效地减少卷曲和重叠。另外, 饱和 NaCl 溶液产生的浮力可使密度最小的植物碎片完全上浮贴近盖玻片, 密度最大的碎片下沉贴近载玻片, 而部分密度居中的碎片则漂浮于溶液之中, 这样, 尽管密度不同的碎片在空间上可能上下重叠, 但通过显微镜的微调仍然可以分别清楚地观察它们并进行识别。我们曾采用清水作装片介质, 但由于其密度较小, 产生的浮力不足以将密度不同的植物碎片分层展示, 故重叠率仍然较高, 改用饱和 NaCl 溶液后, 结果显著改善。

需要指出的是, 常规装片方法可以制作永久性封片, 供反复观察使用, 而新的装片技术则注重提高可识别率, 不适合作永久性封片。尽管如此, 但由于每张切片上的全部植物碎片信息可以数码照片形式记录和保留, 从而, 弥补了该技术不适合作永久性封片的缺点。

此外, 新的装片技术操作简便、易行, 所需试剂、器材容易得到, 或可自制; 试验结果可重复性强, 而且可以得到大量清晰的植物碎片照片, 因而, 在食草动物的食性分析研究中有一定应用价值。

#### 参考文献:

Alipauo D, Valdez R, Holecck J. 1992. Evaluation of microhistological analysis for determining ruminant diet botanical composition. *Journal*

- of Range Management*, **45** (2): 148 - 152.
- Arceo G, Mandujano S, Gallina S, Perez-Jimenez L A. 2005. Diet diversity of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) in a tropical dry forest in Mexico. *Mammalia*, **69** (2): 159 - 168.
- Barker R D. 1986. An investigation into the accuracy of herbivore diet analysis. *Aust Wildl Res*, **13**: 559 - 568.
- Baugataer L L, Martin A C. 1939. Plant histology as an aid in squirrel food habits studies. *Jour Wildl Mgt*, **3**: 266 - 268.
- Chen H P, Xiao Q Z. 1989. Winter food habits of red deer in Dailing. *Acta Theriologica Sinica*, **9**: 8 - 15. (in Chinese)
- Dusi J L. 1949. Methods for the determination of food habits by plant microtechniques and histology and their application to cottontail rabbit food habits. *Journal of Wildlife Management*, **13**: 295 - 298.
- Guo G P, Zhang E D. 2005. Diet of the Chinese water deer (*Hydropotes inermis*) in Zhoushan archipelago, China. *Acta Theriologica Sinica*, **25**: 122 - 130.
- Hansen R M, Peden D G, Rice R W. 1973. Discerned fragments in feces indicates diet overlap. *Journal of Range Management*, **26** (2): 103 - 105.
- Hansen L M. 1974. Plant fragments in the feces of bighorns as indicators of food habits. *Journal of Wildlife Management*, **37** (3): 363 - 366.
- Hansen R M. 1981. The microhistological analysis of feces as an estimator of herbivore dietary (Personal communication). Range Science Dep. Colorado State Univ., Fort Collins Colorado 80523.
- Holecck J L. 1982. Sample preparation techniques for microhistological analysis. *Journal of Range Management*, **35** (2): 267 - 268.
- Holecck J L, Gross B. 1982. Training needed for quantifying simulated diets from fragmented range plants. *Journal of Range Management*, **35** (5): 644 - 647.
- Mellado M, Olvera A, Quero A. 2005. Diets of prairie dogs, goats and sheep on a desert rangeland. *Journal of Range Management*, **58** (4): 373 - 379.
- Norbury G L. 1988. Microscopic analysis of herbivore diets - A problem and a solution. *Aust Wildl Res*, **15**: 51 - 57.
- Putman R J. 1984. Facts from faeces. *Mammal Review*, **14**: 79 - 97.
- Sandoval L, Holecck J, Biggs J. 2005. Elk and mule deer diets in north-central new Mexico. *Journal of Range Management*, **58** (4): 366 - 372.
- Sparks D R, Malecck J C. 1968. Estimating percentage dry weight in diets using a microscopic technique. *Journal of Range Management*, **21**: 264 - 265.
- Storr G M. 1961. Microscopic analysis of faeces, a technique for ascertaining the diet of herbivorous mammals. *Austral Journal Biol Sci*, **14**: 157 - 164.
- Stewart D R M. 1967. Analysis of plant epidermis in faeces: a technique for studying food preferences of grazing herbivores. *Journal Applied Ecology*, **4**: 83 - 111.
- Williams O B. 1969. An improved technique for identification of plant fragments in herbivore feces. *Journal of Range Management*, **22**: 51 - 52.
- Zheng R Q, Bao Y X. 2004. Study methods and procedures for ungulate food habits. *Acta Ecologica Sinica*, **24**: 1532 - 1539. (in Chinese)
- 陈化鹏, 萧前柱. 1989. 带岭林区马鹿冬季食性研究. 兽类学报, **9** (1): 8 - 15.
- 郑荣泉, 鲍毅新. 2004. 有蹄类食性研究方法及其研究进展. 生态学报, **24** (7): 1532 - 1539.