

ISSN 1000-0933

CN 11-2031/Q

生态学报

Acta Ecologica Sinica



第31卷 第17期 Vol.31 No.17 **2011**

中国生态学学会
中国科学院生态环境研究中心
科学出版社

主办
出版



中国科学院科学出版基金资助出版

生态学报

(SHENGTAI XUEBAO)

第 31 卷 第 17 期

2011 年 9 月 (半月刊)

目 次

海洋生态资本理论框架下海洋生物资源的存量评估·····	任大川,陈 尚,夏 涛,等 (4805)
内生真菌对羽茅生长及光合特性的影响·····	贾 彤,任安芝,王 帅,等 (4811)
基于遥感图像处理技术胡杨叶气孔密度的估算及其生态意义·····	蒋圣淇,赵传燕,赵 阳,等 (4818)
水文变异下的黄河流域生态流量·····	张 强,李剑锋,陈晓宏,等 (4826)
黄河三角洲重度退化滨海湿地盐地碱蓬的生态修复效果·····	管 博,于君宝,陆兆华,等 (4835)
浙江省某 PCBs 废物储存点对其邻近滩涂生态系统的毒性风险·····	何闪英,陈昆柏 (4841)
鄱阳湖苔草湿地甲烷释放特征·····	胡启武,朱丽丽,幸瑞新,等 (4851)
三峡库区银鱼生长特点及资源分析·····	邵晓阳,黎道峰,谭 路,等 (4858)
低温应激对吉富罗非鱼血清生化指标及肝脏 HSP70 基因表达的影响 ···	刘 波,王美珏,谢 骏,等 (4866)
Cd ²⁺ 对角突臂尾轮虫和曲腿龟甲轮虫的急性毒性和生命表统计学参数的影响 ·····	许丹丹,席貽龙,马 杰,等 (4874)
圈养梅花鹿 BDNF 基因多态性与日常行为性状的关联分析 ·····	吕慎金,杨 燕,魏万红 (4881)
华北平原玉米田生态系统光合作用特征及影响因素 ·····	同小娟,李 俊,刘 渡 (4889)
长期施肥对麦田大型土壤动物群落结构的影响 ·····	谷艳芳,张 莉,丁圣彦,等 (4900)
蚯蚓对湿地植物光合特性及净化污水能力的影响·····	徐德福,李映雪,王让会,等 (4907)
三种农药对红裸须摇蚊毒力和羧酸酯酶活性的影响 ·····	方国飞 (4914)
六星黑点豹蠹蛾成虫生殖行为特征与性趋向·····	刘金龙,宗世祥,张金桐,等 (4919)
除草剂胁迫对空心莲子草叶甲种群的影响及应对策略·····	刘雨芳,彭梅芳,王成超,等 (4928)
荒漠植物准噶尔无叶豆结实、结籽格局及其生态适应意义 ·····	施 翔,王建成,张道远,等 (4935)
限水灌溉冬小麦冠层氮分布与转运特征及其对供氮的响应·····	蒿宝珍,姜丽娜,方保停,等 (4941)
准噶尔盆地梭梭、白梭梭植物构型特征 ·····	王丽娟,孙栋元,赵成义,等 (4952)
基于地表温度-植被指数关系的地表温度降尺度方法研究 ·····	聂建亮,武建军,杨 曦,等 (4961)
岩溶区不同植被类型下的土壤氮同位素分异特征 ·····	汪智军,梁 轩,贺秋芳,等 (4970)
施氮量对麻疯树幼苗生长及叶片光合特性的影响 ·····	尹 丽,胡庭兴,刘永安,等 (4977)
黄土丘陵区羔沟流域典型植物叶片 C、N、P 化学计量特征季节变化 ·····	王凯博,上官周平 (4985)
克隆整合提高淹水胁迫下狗牙根根部的活性氧清除能力·····	李兆佳,喻 杰,樊大勇,等 (4992)
低覆盖度固沙林的乔木分布格局与防风效果·····	杨文斌,董慧龙,卢 琦,等 (5000)
东灵山林区不同森林植被水源涵养功能评价·····	莫 菲,李叙勇,贺淑霞,等 (5009)
11 种温带树种粗木质残体分解初期结构性成分和呼吸速率的变化 ·····	张利敏,王传宽,唐 艳 (5017)
连栽第 1 和第 2 代杉木人工林养分循环的比较·····	田大伦,沈 燕,康文星,等 (5025)
最优化设计连续的自然保护区·····	王宜成 (5033)
基于自然地理特征的长江口水域分区·····	刘录三,郑丙辉,孟 伟,等 (5042)
煤电一体化开发对锡林郭勒盟环境经济的影响·····	吴 迪,代方舟,严 岩,等 (5055)
专论与综述	
生态条件的多样性变化对蜜蜂生存的影响·····	侯春生,张学锋 (5061)
研究简报	
胶州湾潮间带大型底栖动物次级生产力的时空变化·····	张崇良,徐宾铎,任一平,等 (5071)
湿地公园研究体系构建·····	王立龙,陆 林 (5081)
基于生态足迹的半干旱草原区生态承载力与可持续发展研究——以内蒙古锡林郭勒盟为例·····	杨 艳,牛建明,张 庆,等 (5096)
学术信息与动态	
恢复与重建自然与文化的和谐——2011 生态恢复学会国际会议简介 ···	彭少麟,陈蕾伊,侯玉平,等 (5105)
期刊基本参数:CN 11-2031/Q * 1981 * m * 16 * 302 * zh * P * ¥ 70.00 * 1510 * 37 * 2011-09	



封面图说: 相当数量的降雪与低温严寒是冰川发育的主要因素,地球上的冰川除南北两极外,只有在高海拔的寒冷山地才能存在。喜马拉雅山造山运动使中国成为了世界上中低纬度冰川最为发育的国家,喜马拉雅山地区雪峰连绵、冰川四溢,共有现代冰川 17000 多条,是世界冰川发育的中心之一。

彩图提供: 陈建伟教授 国家林业局 E-mail: cites.chenjw@163.com

吕慎金, 杨燕, 魏万红. 圈养梅花鹿 BDNF 基因多态性与日常行为性状的关联分析. 生态学报, 2011, 31(17): 4881-4888.

Li S J, Yang Y, Wei W H. The association of BDNF gene polymorphisms with normal behavior traits in house-hold sika deer (*Cervus nippon*). Acta Ecologica Sinica, 2011, 31(17): 4881-4888.

圈养梅花鹿 BDNF 基因多态性与 日常行为性状的关联分析

吕慎金^{1,*}, 杨 燕², 魏万红³

(1. 临沂大学生命科学学院, 临沂 276005; 2. 山东省临沂市农业科学院, 临沂 276012;

3. 扬州大学生命科学与技术学院, 扬州 225009)

摘要: 采用目标动物取样法(Focal Animal Sampling)和全事件记录方法(All-occurrence Recording), 观察统计了江苏省扬州市平山堂养殖场及扬州市动物园共 48 只梅花鹿日间日常行为节律。以脑源性神经生长因子(Brain-derived Neurotrophic Factor, BDNF)为目的基因, 采用 PCR-SSCP 方法, 研究梅花鹿行为性状与基因多态性之间的关联。结果表明, 在 P-4 引物, AA 与 BB 基因型在卧息行为上存在显著差异($P < 0.05$), 在运动行为上存在极显著差异($P = 0.001$)。在 P-5 引物, CC/DD/CD 基因型在观望行为上两两差异显著, 并且 CC 和 DD 基因型在卧息与修饰行为均存在显著差异($P < 0.05$)。研究表明, BDNF 基因多态性和动物日常行为性状存在一定相关。

关键词: 梅花鹿; BDNF 多态性; PCR-SSCP; 行为性状

The association of BDNF gene polymorphisms with normal behavior traits in house-hold sika deer (*Cervus nippon*)

LÜ Shenjin^{1,*}, YANG Yan², WEI Wanhong³

1 College of Life Science, Linyi University, Linyi 276005, China

2 Linyi Academy of Agricultural Sciences, Linyi 276012, China

3 College of Bio-science & Bio-technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China

Abstract: It is widely accepted that brain derived neurotrophic factor (BDNF) is involved in modulating behavioral performance in response to environmental conditions. The BDNF gene has been intensively studied; however, no studies have addressed the effect of BDNF gene polymorphisms on behavioral traits in sika deer (*Cervus nippon*). This study investigated the relationship between single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the BDNF gene and behavior traits of sika deer in a semi-housed environment. This study was performed on Ping-Shan-Tang farm (25 deer) and in Zhu-Yu-Wan Park (23 deer), Yangzhou, Jiangsu province, China. The deer on Ping-Shan-Tang farm were housed in four 20×10 m paddocks with shelters of mantle. In Zhu-Yu-Wan Park, the deer roamed in a fenced paddock of grasses, shrubs and trees (120 m × 80 m). All deer were marked by ear-notches and collar-tags for easy identification and were aged between 3 and 7 years. Observations were conducted at the same time each day between 08:30 a. m to 16:30 p. m and deer were sampled in a different order each day (using random numbers). Each individual was studied for a mean ($\pm$ S. E.) of (33.3 $\pm$ 0.09) h and over a total of 50 weeks, 1600 h were spent observing the deer. All data were obtained with focal animal sampling and all-occurrence recording. After all observations, blood samples (10 mL) were collected from the jugular vein using vacuum tubes with acid citrate dextrose anticoagulant and then stored at -20°C. Genomic DNA was extracted from whole blood using

基金项目: 国家自然科学基金项目(31001027)

收稿日期: 2010-07-27; 修订日期: 2011-02-14

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: lvshenjin@lyu.edu.cn

a standard phenol/chloroform protocol, dissolved in sterile water at a concentration of 100 ng/ μ L and then kept at -20°C until use. PCR amplification and SSCP analysis of the BDNF gene were performed using six pairs of primers. Two pairs of primers (P-4 and P-5) amplified polymorphic fragments. P-4 yielded a 249 bp fragment and P-5 yielded a 224 bp fragment. Three genotypes were identified by SSCP for each of the fragments amplified by the primer pairs. All behavior trait data were analyzed by one way ANOVA analysis using SPSS 14.0 software. Effects of SNPs on behavior traits were analyzed and the SNP markers that showed significant correlation with behavior traits were further studied through post-hoc multiple comparison. The results showed that: (1) The AA genotype of the P-4 fragment, had significantly greater effects on relaxing behavior compared to the BB genotype ($P < 0.05$), and had highly significant effects on moving behavior ($P = 0.001$). (2) Highly significant differences in observing behavior were produced among the CC, DD and CD genotypes of the primer P-5 fragment. Also we found a highly significant difference between the CC and DD genotypes with respect to relaxing behavior ($P < 0.05$). The same results were found on the grooming behavior ($P < 0.05$). We conclude that polymorphisms in the BDNF gene may be involved in some aspects of behavioral traits in sika deer.

Key Words: sika deer; BDNF polymorphisms; PCR-SSCP; animal behavior

脑源神经生长因子(Brain-derived Neurotrophic Factor, BDNF)是G蛋白偶联受体家族中的一个类型,其结构为747bp片段构成(牛)的一个开放阅读框,无内含子,包含245个氨基酸组成的蛋白质。最先是由德国神经生物学家Barde报道^[1]。BDNF基因是一个与动物应激、社会行为、记忆以及母性缺失有关的基因^[2-3]。研究表明,外界刺激、物理训练、饲养环境对BDNF的mRNA表达都有一定的影响^[4-5]。报道指出,BDNF突变基因型和动物紧张行为存在显著相关^[6],并且这种遗传突变大多数情况下是由环境引起^[7]。

梅花鹿属于哺乳纲(Mammalia)、偶蹄目(Artiodactyla)、鹿科(Cervidae)、花鹿属(*Cervus*)。我国梅花鹿共6个亚种:东北亚种(*Cervus Nippon hortulorum*)、华南亚种(*C. N. pseudaxis*)、四川亚种(*C. N. Sichuanicus*)、台湾亚种(*C. N. taiouamus*)、山西亚种(*C. N. grassiamus*)和河北亚种(*C. N. mandarinus*)^[8]。目前,我国野生梅花鹿仅存3个亚种,都被列为国家I级保护动物^[9]。人工饲养梅花鹿的品系主要是在东北亚种的基础上经选育而成^[10]。近年来,国内对圈养梅花鹿生物学报道较多,主要集中在饲养繁殖、疾病防治、品系培育、鹿茸生产等方面,对梅花鹿的行为学、遗传学研究也有报道^[11-13],而与行为性状紧密相关的BDNF基因多态性和圈养条件下梅花鹿昼间日常行为变化是否相关尚无报道。因此,本研究以PCR-SSCP技术为手段,分析了BDNF基因在梅花鹿中的单核苷酸多态性,以验证基因多态性和动物行为性状是否关联,旨在为今后进一步研究BDNF基因在鹿科动物行为遗传特性提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 研究材料

本研究梅花鹿来自扬州市动物园和扬州平山堂养殖场两地。平山堂养殖场占地面积约1500 m^2 ,共4个半敞开式圈舍,每个圈舍面积20 $\text{m} \times 10 \text{ m}$,共观测记录25只成年梅花鹿(其中♂15只,♀10只)。江苏省扬州市动物园位于扬州市郊区湾头镇,该园占地面积约52.6 hm^2 ,梅花鹿个体散放公园食草区内(100 $\text{m} \times 50 \text{ m}$),共观测记录23只(♂13只,♀10只)。两地梅花鹿饲喂时间均为每天8:00和15:00左右各1次。主要为白三叶(*Trifolium repens*)、紫花苜蓿(*Medicago sativa*)和其它青草,补充精料为配合饲料,饲料主成分为玉米(60%)、麸皮(16%)、食盐(1%)及多种维生素、矿物质、微量元素等。

1.2 研究方法

1.2.1 行为性状观察

首先对两地梅花鹿个体进行辨识,让梅花鹿适应外人进入场地。利用耳标、角的形状及身体上的斑痕及个体大小等体型外貌特征区分梅花鹿个体。

在正式观察之前进行为期7 d的预观察,采用目标动物取样法观察动物的行为,观测记录个体行为发生

持续时间,确定动物的行为格局。正式观察时间为 2006 年 7—12 月及 2007 年 2—6 月,每周观察 4 d。两地圈养条件梅花鹿每天饲喂 2 次,分别为 8:00 h 及 15:00 h,结合预观察结果,观察者选择每天 8:30—16:30 h 在 5—15 m 距离处对动物进行观察,所有行为数据均以每天(8 h)各行为持续时间记录。为减小不同观察者之间的差异,所有观察者都经过 7 d 预观察培训,观察时 1 人观察口述,1 人记录,每 2 h 轮换 1 次。目标动物观测选择按照随机次序进行,以降低观测次数的不平衡。根据不同饲养条件下梅花鹿生理特点以及前人的研究结论,参照有关梅花鹿行为谱研究结论^[14],将梅花鹿行为参数定义如下:

取食 梅花鹿的上下唇协同动作,对青草、饲料等食物进行切割、咀嚼、吞咽的过程。如果梅花鹿在卧倒和移动过程中,有上述动作发生,仍将其视为取食行为。

反刍 梅花鹿在非睡眠时,头部高于背中线,对食物进行逆呕、咀嚼等过程,反刍分站立反刍和卧倒反刍。

卧息 梅花鹿的卧息包括休息、浅睡和睡眠。卧下时,前肢先跪下,后肢下蹲,接着腹部着地,最后臀部触地。卧姿分为左侧卧和右侧卧。

观望 梅花鹿头昂起,耳朵朝有异响或异样方向转动,四肢静止不动,情况危急时则尾巴翘起,用力踏地。观望是相当于警戒或仅次于警戒的一种行为。

移动 梅花鹿从一地点到另外一地点的动作,移动包括走动和跑动,以走动为主,只有遇到危险时才跑动。

修饰 指梅花鹿为求得舒适而进行的自洁行为及排除蚊蝇干扰或对身体某些部位进行舔舐、轻咬、蹭墙、搔扒等行为。

其它 指梅花鹿的饮水、排尿、排粪、嬉戏、鸣叫等。

观测过程中,如果由于天气等原因不能观测,则在 1 周内补充观测。由于动物园梅花鹿受游客影响较大,因此,在观测中,周末以及国家法定节日观测动物园梅花鹿不放一起统计分析。观测结束后,对行为记录数据进行整理,录入计算机进行分析。

1.2.2 血样采集

梅花鹿麻醉后颈静脉采血 5—10 mL,置于 15 mL 指型管中(内置 1—2.5 mL 裂解液),充分摇动至血细胞完全破裂,溶液呈粘稠状为止;两地共采集样本 48 份,其中,扬州平山堂养殖场共采集血样 25 份(♂ 15 只,♀ 10 只);动物园采集样本 23 份(♂ 13 只,♀ 10 只)。

1.2.3 引物信息

应用 Primer Premier 5.0 软件,根据 GenBank 收录的有关 BDNF 基因序列 FD698038、NM_007540 和 BP460083,设计引物(表 1)。各引物均由上海生工科技有限公司合成。引物稀释过程分 2 步进行:首先稀释为正常扩增的 10 倍浓度,−20℃ 长期保存;使用时再稀释 10 倍,作为正常使用的引物浓度。

表 1 梅花鹿 BDNF 基因引物信息
Table 1 Information of primers for sika deer with BDNF gene

位点 Locus	引物 Primer sequences/5' to 3'	大小 PCR size/bp	退火温度/℃ Annealing temperature
P-1	GTTATTTCTACTTCGGTTGC;GGGAGTTCCAATGCCTC	604	55.4
P-2	GTTATTTCTACTTCGGTTGC;AATACGCTTTTGTCTATCCATGGTT	663	55.4
P-3	TGAAAGAAGCCAACCTCC;GAACCGCCAGCCAATAC	638	55.7
P-4	GGTATTTCTACTTCGGTTGC;TCCGCGTCTTTATTGTTTT	249	54
P-5	CCAAGGTGGGTTCAAGAG;TGCGGCATCCAGGTAA	224	53.5
P-6	TGGATGCCGCAACAT;GAACCGCCAGCCAATAC	341	55.6

1.2.4 最佳 PCR 扩增体系

PCR 反应体系为 20 μL,其中 0.20 μL (5 U/μL) Taq 酶, 2.20 μL 10×buffer(含 Mg²⁺), 1.20 μL 浓度为 1 μmol/L 引物, 1.20 μL 浓度为 2.0 mmol/L dNTPs, 1.40 μL 浓度为 50 ng/L 基因组 DNA,最后用去离子灭

菌水补齐至 20 μL 体系。*PCR* 反应程序如下: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 然后 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s, 54 $^{\circ}\text{C}$ 退火 40 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 共 33 个循环。72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min, 产物 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.3 分析方法

建立模型:

$$y_{ij} = u + I_i + e_{ij}$$

式中, y_{ij} 为行为性状观测值; u 为群体均值; I_i 为第 i 基因型效应值; e_{ij} 为随机误差。应用 SPSS 软件一般线性模型, 对不同基因型与行为性状的关系进行比较分析。所有动物行为性状以 8 h 统计记录, 以行为持续时间 ($M \pm SE$) 为观测变量, 以不同基因型作为另一变量, 输入 SPSS 软件分析系统, 即可进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 提取结果

从梅花鹿血样中提取的基因组 DNA 溶于 300 μL TE 中, 室温溶解 24 h 后用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。结果表明提取的基因组没有降解, 长度在 30 kb 以上, 所含 DNA 符合生物学试验要求 (图 1)。

2.2 *PCR* 扩增产物检测

在设计的 6 对引物中, 只有引物 P-4 与 P-5 获得扩增产物 (图 2)。

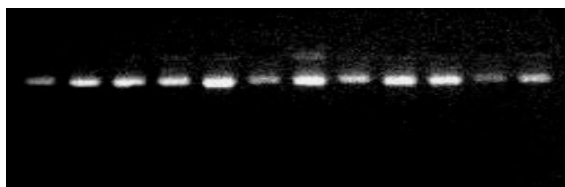


图 1 梅花鹿基因组 DNA

Fig. 1 The genome DNA of sika deer

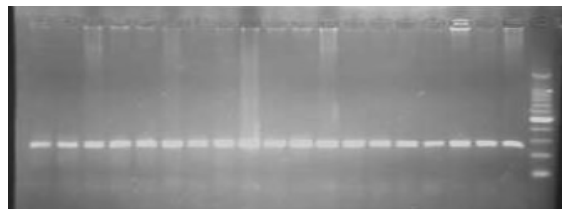


图 2 引物 P-4 *PCR* 产物检测结果

Fig. 2 Result of agarose gel electrophoresis for *PCR* product of Primer P-4

引物 P-4 *PCR* 扩增产物经 10%、29:1 的非变性聚丙烯酰胺凝胶检测有 3 种基因型, 分别命名为 AA、AB、BB, 检测结果如图 3。

对引物 P-5 进行 *SSCP* 分析, 结果表现 3 种基因型, 分别命名为 CC、CD、DD, 见图 4。

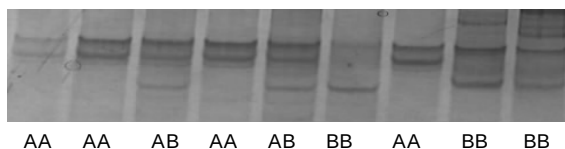


图 3 引物 P-4 多态性检测结果

Fig. 3 Result of polymorphism amplified by primer P-4

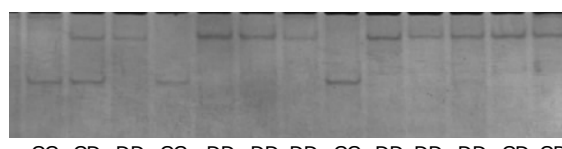


图 4 引物 P-5 多态性检测结果

Fig. 4 Result of polymorphism amplified by primer P-5

2.3 测序结果与同源性分析

2.3.1 BDNF 基因测序结果及同源性比较

本研究将 BDNF 基因各对引物所得纯合子 *PCR* 产物送上海生物工程公司进行正反向测序, 并用 Align IR 软件和 Blast 软件将测序结果与 BDNF 的 DNA 序列进行比对。BDNF 基因与猪序列比对结果显示其同源性达到 92%; 与牛科动物比对结果同源性高达 98%。因此, 所获得序列可以证明是梅花鹿 BDNF 基因序列的片段。通过测序图比对发现 (图 5), 在引物 P-4 扩增产物中, 在其 157bp 发生 C $\rightarrow$ T 的突变;

同样对于引物 P-5, 测序结果表明 (图 6), 在其 127bp 处发生 G $\rightarrow$ A 的突变。氨基酸序列分析表明, 这两处突变均为沉默突变。

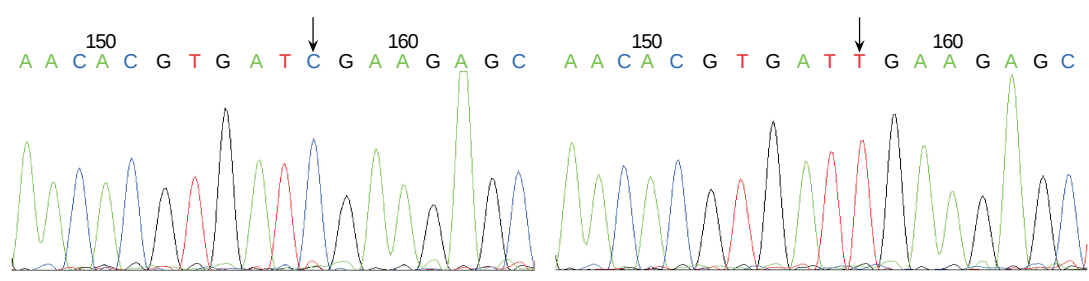


图 5 BDNF 基因 P-4 引物测序结果比对

Fig. 5 The sequencing alignment of P-4 primers of BDNF gene

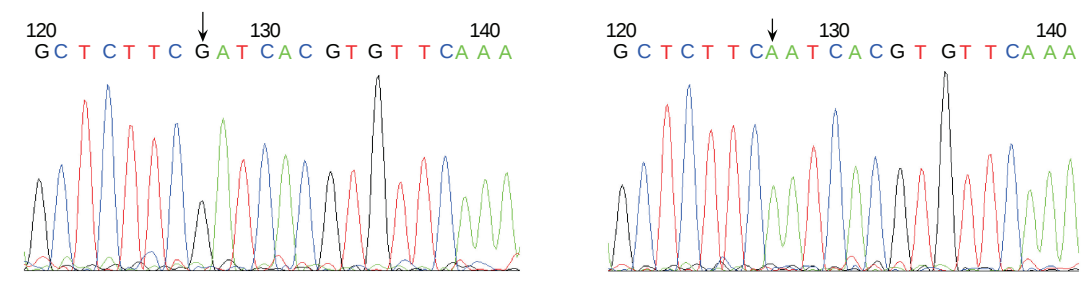


图 6 BDNF 基因 P-5 引物测序结果比对

Fig. 6 The sequencing alignment of P-5 primers of BDNF gene

2.3.2 BDNF 基因的基因频率和基因型频率及 Hardy-Weinberg 平衡检验

在梅花鹿两个群体中,对 BDNF 引物 P-4 和 P-5 的基因频率和基因型频率进行检测,结果见表 2。

表 2 表明,在 BDNF 基因引物 P-4 扩增结果中检测 3 种基因型,其中 AA 型基因型频率最高,而 AB 型基因型频率最低。在引物 P-5 扩增结果中也检测到 3 种基因型,其中纯合子 DD 的基因型频率最高,杂合子 CD 基因型频率最低。适合性 χ^2 检验结果表明,梅花鹿在该两个位点均处于 Hardy-Weinberg 不平衡状态($P<0.01$)。

表 2 BDNF 基因各引物基因频率和基因型频率及 Hardy-Weinberg 平衡检验

Table 2 Gene and genotype frequency and equilibrium test of Hardy-Weinberg for BDNF gene							
引物 Primer	检测 Detect	基因 Gene		基因型 Genotype			χ^2
P-4		A	B	AA	BB	AB	
	No		26	16	6		
	Value	0.604	0.396	0.542	0.333	0.125	12.50
P-5		C	D	CC	DD	CD	
	No			9	32	7	
	Value	0.260	0.740	0.188	0.667	0.146	24.13

引物 P-4/P-5: $df=2$, $\chi^2_{0.05(2)}=5.99$, $\chi^2_{0.01(2)}=9.21$

2.3.3 BDNF 基因多态性与行为性状的相关分析

对 BDNF 基因 SNP 位点基因型与梅花鹿个体行为性状进行最小二乘分析(表 3)。结果表明引物 P-4 基因型对梅花鹿卧息行为有显著影响($P<0.05$);对移动行为有极显著影响($P<0.01$);对其余各行为性状无显著影响。引物 P-5 产物获得各基因型对卧息行为有显著影响($P<0.05$),对观望行为有极显著影响($P<0.01$),对其余性状均无显著影响。

对 BDNF 基因引物 P-4 和 P-5 不同基因型各行为性状的最小二乘均值进行多重比较(表 4)。可知对两地梅花鹿群体,引物 P-4 各基因型间卧息行为 AA 型比 BB 型持续时间少 50 min,且差异显著($P<0.05$),但与 AB 型差异不显著;移动行为 AA 型比 BB 型持续时间少 12 min 左右,且差异显著($P<0.05$);但和 AB 型差异

不显著。

表 3 BDNF 基因多态性对梅花鹿行为性状的影响 (F 和 P)

Table 3 The influence of BDNF gene polymorphism to behaviour traits in sika deer

性状 Characteristic	引物 P-4 Primer P-4		引物 P-5 Primer P-5	
	F	P	F	P
取食 Eating	0.315	0.732	0.380	0.686
反刍 Ruminating	0.113	0.893	0.429	0.654
卧息 Relaxing	3.299	0.046	4.507	0.016
观望 Observing	1.894	0.162	59.554	0.000
移动 Moving	8.358	0.001	1.606	0.212
修饰 Grooming	0.395	0.676	2.368	0.105
其他 Others	2.143	0.129	1.602	0.213

表 4 BDNF 基因不同基因型在梅花鹿各行为性状中的比较

Table 4 Comparison for behaviour traits of each genotype of BDNF in sika deer/min

行为性状 Behavior traits	引物 P-4 基因型 Genotype of primer P-4			引物 P-5 基因型 Genotype of primer P-5		
	AA	BB	AB	CC	DD	CD
取食 Eating	243.926±12.011	231.251±9.969	247.445±27.258	231.903±15.945	245.044±9.720	228.319±25.527
反刍 Ruminating	38.763±3.971	35.741±6.597	39.742±8.176	31.757±4.411	39.547±4.471	38.119±5.245
卧息 Relaxing	101.724±11.059 ^a	151.558±15.518 ^b	126.478±32.485	87.073±11.495 ^a	120.798±10.935 ^b	173.631±28.145 ^b
观望 Observing	56.360±6.509	40.579±5.971	37.268±11.340	99.389±7.469 ^a	41.113±2.747 ^b	18.291±2.986 ^c
移动 Moving	21.554±2.263 ^a	9.066±1.306 ^b	13.867±4.249	17.896±4.057	17.527±1.994	9.531±2.890
修饰 Grooming	7.223±1.376	6.199±1.067	4.978±1.980	3.239±1.402 ^a	7.799±1.138 ^b	5.444±1.260
其它 Others	10.415±1.613	5.606±0.784	10.222±4.876	12.743±3.350	8.140±1.281	6.664±2.032

同一行标有不同上标表示差异显著 ($P<0.05$)

在两地梅花鹿行为性状中,引物 P-5 各基因型间观望行为持续时间 CC、DD、CD 型依次减少,且两两之间差异显著;卧息行为 CC 型比 DD 型少近 40 min,比 CD 型少近 90 min,且和两者均差异显著 ($P<0.05$);修饰行为 CC 型比 DD 型少 4 min 多,且两者差异显著 ($P<0.05$)

3 讨论

3.1 BDNF 基因多态性与群体遗传学分析

根据哈代-温伯格原理,群体处于平衡状态是一个随机交配的理想大群体。因此,基因频率在群体内的平衡是相对的,而变异则是绝对的。本试验材料梅花鹿群体引自东北双阳梅花鹿,已经在本地区生活 5 a 以上,其性能基本稳定,在驯化饲养过程中,基本按照梅花鹿个体生活特点进行,其饲养管理由专门饲养员负责。本研究在梅花鹿上所检测基因频率和基因型频率的差异可能是由于对其相关行为性状的选择而引起的,由于行为性状对于半驯化动物,特别是对强应激动物而言,研究其行为的适应性及遗传特性更有价值和意义,通过实验结论可初步推断该基因位点与相关行为性状存在相关。

分析表明 BDNF 基因引物 P-4 与 P-5 位点扩增结果中均检测到 3 种基因型,且在两个位点都处于 Hardy-Weinberg 不平衡状态。群体不平衡可能是由于基因的遗传漂变或选择、选配等因素所致。由于本研究中样本含量较少,尚不足以满足实验要求,这是造成检测群体处于不平衡状态的主要原因。另外,本研究结论也可能说明两地梅花鹿群体在饲养管理过程中该位点一直受到选择的影响;同时分析可知,该群体可能的确处于不平衡状态,原因是长期的群体内闭锁繁育造成群体不平衡。所以要保持现有梅花鹿群体基因频率不变,保存现有基因资源,在对梅花鹿群体选育时首先考虑防止遗传漂变现象的发生;同时考虑选择、选配对群体基因频率的影响,结合当前动物保护的发展趋势及生产实际要求,在群体规模足够大时开展杂交、适度近交及人工选配。

3.2 BDNF 基因多态性与行为性状的关系

本研究梅花鹿群体已在当地成功生活繁殖 5 a 以上,其基因之间的连锁关系逐渐趋于稳定,比较适合用

于寻找影响其行为性状和经济性状的候选基因研究。同时本研究对候选基因的变异与其行为性状进行相关分析,力图搜寻与梅花鹿行为性状相连锁的分子标记,为实施梅花鹿分子标记辅助选择提供理论依据。

近年来的许多研究表明 BDNF 与运动引起的认知提高密切相关^[15]。关于梅花鹿 BDNF 基因与行为性状的相关分析,至今尚还未见报道,因此,本研究中分析结果尚无法和相关文献对比分析。但本研究结果与在模式动物小鼠和人类的研究结论基本一致^[16-17]。但另有研究表明 BDNF 的缬氨酸到甲硫氨酸(Val→Met)突变并没有造成代偿性的固有途径分泌的增高或降低,却引起 Met BDNF 在核周的聚集^[18]。因此,现在尚不清楚 BDNF 基因多态性如何影响神经功能、脑结构以及动物行为性状。早期研究表明,BDNF 基因杂合子与纯合子小鼠在情绪表现、攻击行为以及取食行为方面与纯合子差异显著^[19],本研究在 P-4 位点检测结果表明圈养梅花鹿群体与上述研究结论类似。周华东等运用 *RFLP* 等方法研究 BDNF 基因多态性与绝经后妇女认知障碍关系发现,BDNF 196A/G 基因型分布在认知功能障碍组与对照组之间差异有统计学意义^[20]。BDNF 196A/G 杂合子与认知功能相对危险度是 BDNF 196G/G 基因型的 3.45 倍;BDNF 196A/A 纯合子与认知探究功能障碍的相对危险度是 1.43 倍。可见,不同基因型对认知探究功能的影响存在差异,在本研究实验群体,不同个体表现出卧息和移动行为的显著差异,在观测中发现,运动行为表现明显的梅花鹿个体,其行为表现更为丰富,其表现出对新鲜事物(声音、游客等)更高的兴趣。相反,卧息行为表现高的个体,其基本对外界变化反应较小或者不反应。因此,可以认为动物运动表现的差异是对外界认知探究表现不同所致。

有研究表明 BDNF 基因二核苷酸重复多态性的 A1 等位基因可能对儿童应激孤独症的症状表达具有抑制作用,而 A3 等位基因对应激孤独症的症状表达有促发作用^[21]。本研究在 P-5 位点发现不同梅花鹿个体观望行为之间存在极显著差异。梅花鹿观望行为认为是动物对外界环境的一种警戒和应激,故可以初步认为,BDNF 基因对梅花鹿观望和卧息行为有一定的潜在作用,不同基因型之间可能是个体行为表现不同的最根本原因。

对小鼠研究表明,被动逃避学习测验后,行为表现好的大鼠海马齿状核 BDNF mRNA 水平显著增加^[22]。运用八臂放射性迷宫对大鼠进行认知和工作记忆的训练,发现大鼠空间学习记忆的获得伴随着实验 15—30 min 后海马 BDNF mRNA 表达水平增加。进一步研究发现,与对照组相比,实验动物海马 BDNF 主要受体 TrkB(tyrosine kinase B)的磷酸化水平选择性地与空间记忆的获得平行增加^[23]。这些研究显示,学习任务训练过程,可引起动物中枢神经系统 BDNF 基因表达增加,并可由此激活其受体 TrkB。因此,梅花鹿进行驯化养殖过程中,可以有针对性的开展行为习性训练,以增加其 BDNF 基因表达水平,使梅花鹿减少应激水平,改善其行为特性。本研究初步表明,BDNF 基因突变可能和动物行为性状存在相关,长期的封闭圈养以及游客可能是造成动物行为性状改变最直接的原因,随时间推移,闭锁繁育导致其遗传突变。因此,还应尽量扩大梅花鹿生存空间,同时每年都适当引入外血,制定合理的配种制度,减缓其遗传突变水平。

致谢:感谢扬州茱萸湾动物园郑文明、李文斌、闻亮、季和林以及平山堂养殖场姚亦明等为研究提供实验动物,感谢刘宇庆、杨林、鲍灵铭、刘强国、李丹晶、叶屹萍在动物行为观测中提供帮助。

References:

- [1] Barde Y A, Edger D, Thoenen H. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *European Molecular Biology Organization Journal*, 1982, 1(5): 549-553.
- [2] Gasic G P, Smoller J W, Perlis R H, Sun M, Lee S, Kim B W, Lee M J, Holt D J, Blood A J, Makris N, Kennedy D K, Hoge R D, Calhoun J, Fava M, Gusella J F, Breiter H C. BDNF, relative preference, and reward circuitry responses to emotional communication. *American Journal of Medicine Genetics Part B Neuropsychiatric Genetics*, 2009, 150B(6): 762-781.
- [3] Kang J I, Namkoong K, Ha R Y, Jung K, Kim Y T, Kim S J. Influence of BDNF and COMT polymorphisms on emotional decision making. *Neuropharmacology*, 2010, 58(7): 1109-1113.
- [4] Cotman C W, Berchtold N. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends in Neuroscience*, 2002, 25(6): 295-301.
- [5] Adlard P A, Perreau V M, Engesser-Cesar C, Cotman C W. The timecourse of induction of brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein in

- the rat hippocampus following voluntary exercise. *Neuroscience Letter*, 2004, 363(1): 43-48.
- [6] Hashimoto K. BDNF variant linked to anxiety-related behaviors. *Bioessays*, 2007, 29(2): 116-119.
- [7] Zhu S W, Codita A, Bogdanovic N, Hjerling-Leffler J, Ernfors P, Winblad B, Dickins D W, Mohammed A H. Influence of environmental manipulation on exploratory behaviour in male BDNF knockout mice. *Behavior Brain Research*, 2009, 197(2): 339-346.
- [8] Guo Y S, Zheng H Z. On the geological distribution, taxonomic status of species and evolutionary history of sika deer in China. *Acta Theriologica Sinica*, 2000, 20(3): 168-179.
- [9] Xu H F, Lu H J, Sheng H L, Gu C M. Status and current distribution of south China sika deer. *Chinese Biodiversity*, 1998, 6(2): 87-91.
- [10] Sheng H L, Cao K Q, Li W J. *Cervus Nippon*, the Deer in China. Shanghai: East China Normal University Press, 1992: 8-18.
- [11] Liu H, Shi H Y, Hu J C. Daily activity rhythm and time budget of Sichuan Sika deer (*Cervus nippon sichuanicus*) in spring. *Acta Theriologica Sinica*, 2004, 24(14): 282-285.
- [12] Guo Y S, Zheng H Z. Life table and the rate of natural increase in Sichuan Sika Deer. *Acta Theriologica Sinica*, 2005, 25(2): 150-155.
- [13] Lu X P, Wei F W, Li M, Yang G, Liu H. The relationship between Chinese Sika deer (*Cervus Nippon*) genetic diversity and Japan deer. *Chinese Science Bulletin*, 2006, 51(3): 292-298.
- [14] Whittington C J, Chamove A S. Effects of visual cover on farmed red deer behaviour. *Applied Animal Behavior Science*, 1995, 45(3): 309-314.
- [15] Vaynman S, Ying Z, Gomez-Pinilla F. Hippocampal BDNF mediates the efficacy of exercise on synaptic plasticity and cognition. *European Journal of Neuroscience*, 2004, 20(10): 2580-2590.
- [16] Chourbaji S, Brandwein C, Vogt M, Dormann C, Hellweg R, Gass P. Nature vs. nurture: Can enrichment rescue the behavioural phenotype of BDNF heterozygous mice? *Behavioural Brain Research*, 2008, 192(2): 254-258.
- [17] Gobbo O L, O'Mara S M. Exercise, but not environmental enrichment, improves learning after kainic acid-induced hippocampal neurodegeneration in association with an increase in brain-derived neurotrophic factor. *Behavioural Brain Research*, 2005, 159(1): 21-26.
- [18] Beste C, Baune B T, Domschke K, Falkenstein M, Konrad C. Paradoxical association of the brain-derived-neurotrophic-factor val66met genotype with response inhibition. *European Journal of Neuroscience*, 2010, 166(1): 178-184.
- [19] Kernie S G, Liebl D J, Parada L F. BDNF regulates eating behaviour and locomotor activity in mice. *European Molecular Biology Organization Journal*, 2000, 19(6): 1290-1300.
- [20] Zhou H D, Tang M S, Deng J, Gao C Y. Study of relationship between BDNF gene polymorphism and cognitive impairment in postmenopausal women. *Chongqing Medicine*, 2008, 37(2): 126-128.
- [21] Zhou J X, Guo L T, Huang X Z, Wu K M, Wang Y C, Zhang F R, Ji W D, Huang X Q. The correlative analysis between dinucleotide repeat polymorphism of BDNF gene and autism. *Maternal and Child Health Care of China*, 2007, 22(11): 1483-1485.
- [22] Ma Y L, Wang H L, Wu H C, Wei C L, Lee E H Y. Brain-derived neurotrophic factor antisense oligonucleotide impairs memory retention and inhibits long-term potentiation in rats. *European Journal of Neuroscience*, 1997, 82(4): 957-967.
- [23] Mizuno M, Yamada K, Olariu A, Nawa H, Nabeshima T. Involvement of Brain-derived neurotrophic factor in spatial memory formation and maintenance in a radial arm maze test in rats. *European Journal of Neuroscience*, 2000, 20(18): 7116-7121.

参考文献:

- [8] 郭延蜀, 郑惠珍. 中国梅花鹿地史分布、种和亚种的划分及演化历史. *兽类学报*, 2000, 20(3): 168-179.
- [9] 徐宏发, 陆厚基, 盛和林, 顾长明. 华南梅花鹿的分布和现状. *生物多样性*, 1998, 6(2): 87-91.
- [10] 盛和林, 曹克清, 李文军. 中国鹿类动物. 上海: 华东师范大学出版社, 1992: 8-18.
- [11] 刘昊, 石红艳, 胡锦矗. 四川梅花鹿春季昼夜活动节律与时间分配. *兽类学报*, 2004, 24(14): 282-285.
- [12] 郭延蜀, 郑惠珍. 四川梅花鹿生命表和种群增长率的研究. *兽类学报*, 2005, 25(2): 150-155.
- [13] 吕晓平, 魏辅文, 李明, 杨光, 刘海. 中国梅花鹿 (*Cervus Nippon*) 遗传多样性及与日本梅花鹿间的系统关系. *科学通报*, 2006, 51(3): 292-298.
- [20] 周华东, 唐明山, 邓娟, 高长越. BDNF 基因多态性与绝经后妇女认知功能障碍关系的研究. *重庆医学*, 2008, 37(2): 126-128.
- [21] 周家秀, 郭兰婷, 黄雪竹, 吴康敏, 王英成, 张芙蓉, 季卫东, 黄晓琦. BDNF 基因二核苷酸多态性与儿童孤独症的关系. *中国妇幼保健*, 2007, 22(11): 1483-1485.

CONTENTS

Marine ecological capital: valuation of standing stock of marine living resources	REN Dachuan, CHEN Shang, XIA Tao, et al (4805)
Effect of Endophytic fungi on growth and photosynthetic characteristics of <i>Achnatherum sibiricum</i>	JIA Tong, REN Anzhi, WANG Shuai, et al (4811)
Based on image processing technology estimating leaves stomatal density of <i>Populus euphratica</i> and analysis of its ecological significance	JIAN Shengqi, ZHAO Chuanyan, ZHAO Yang, et al (4818)
Evaluation of the ecological instream flow in the Yellow River basin with hydrological alterations	ZHANG Qiang, LI Jianfeng, CHEN Xiaohong, et al (4826)
The ecological effects of <i>Suaeda salsa</i> on repairing heavily degraded coastal saline-alkaline wetlands in the Yellow River Delta	GUAN Bo, YU Junbao, LU Zhaohua, et al (4835)
Toxicity risks to the closed tidal flat ecosystem of a PCBs waste savepoint at the coast of Zhejiang	HE Shanying, CHEN Kunbai (4841)
Methane emission from a <i>Carex</i> -dominated wetland in Poyang Lake	HU Qiwei, ZHU Lili, XING Ruixin, et al (4851)
The study on Ice-fish Resources in the Three Gorges Reservoir	SHAO Xiaoyang, LI Daofeng, TAN Lu, et al (4858)
Effects of acute cold stress on serum biochemical and immune parameters and liver HSP70 gene expression in GIFT strain of Nile tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>)	LIU Bo, WANG Meiyao, XIE Jun, et al (4866)
Acute toxicity and effect of Cd ²⁺ on life table demography of <i>Brachionus angularis</i> and <i>Keratella valga</i>	XU Dandan, XI Yilong, MA Jie, et al (4874)
The association of BDNF gene polymorphisms with normal behavior traits in house-hold sika deer (<i>Cervus nippon</i>)	LÜ Shenjin, YANG Yan, WEI Wanhong (4881)
Characteristics and controlling factors of photosynthesis in a maize ecosystem on the North China Plain	TONG Xiaojuan, LI Jun, LIU Du (4889)
The soil macrofaunal community structure under a long-term fertilization in wheat field	GU Yanfang, ZHANG Li, DING Shengyan, et al (4900)
Effect of earthworms on the photosynthetic characteristics of wetland plants and their capacity to purify wastewater	XU Defu, LI Yingxue, WANG Ranghui, et al (4907)
Toxicity of three pesticides and their effects on carboxylesterase activity of <i>Prosilocerus akamusi</i>	FANG Guofei (4914)
Reproductive behavior character and sexual tendency of the adult <i>Zeuzera leuconotum</i> Butler (Lepidoptera: Cossidae)	LIU Jinlong, ZONG Shixiang, ZHANG Jintong, et al (4919)
Effects of herbicides stress on the population of alligator weed flea beetles, <i>Agasicles hygrophila</i> (Col.: Chrysomelidae) and corresponding strategies	LIU Yufang, PENG Meifang, WANG Chengchao, et al (4928)
Patterns of fruit and seed production and ecological significance in desert species <i>Eremosparton songoricum</i> (FABACEAE)	SHI Xiang, WANG Jiancheng, ZHANG Daoyuan, et al (4935)
Effect of different nitrogen supply on the temporal and spatial distribution and remobilization of canopy nitrogen in winter wheat under limited irrigation condition	HAO Baozhen, JIANG Lina, FANG Baoting, et al (4941)
Plant architecture characteristics of <i>Haloxylon ammodendron</i> and <i>Haloxylon persicum</i> in Zhungar Basin	WANG Lijuan, SUN Dongyuan, ZHAO Chengyi, et al (4952)
Downscaling land surface temperature based on relationship between surface temperature and vegetation index	NIE Jianliang, WU Jianjun, YANG Xi, et al (4961)
Differential characteristics of soil δ ¹⁵ N under varying vegetation in karst areas	WANG Zhijun, LIANG Xuan, HE Qiufang, et al (4970)
Effect of nitrogen application rate on growth and leaf photosynthetic characteristics of <i>Jatropha curcas</i> L. seedlings	YIN Li, HU Tingxing, LIU Yongan, et al (4977)
Seasonal variations in leaf C, N, and P stoichiometry of typical plants in the Yangou watershed in the loess hilly gully region	WANG Kaibo, SHANGGUAN Zhouping (4985)
Clonal integration enhances the ability to scavenge reactive oxygen species in root of <i>Cynodon dactylon</i> subjected to submergence	LI Zhaojia, YU Jie, FAN Dayong, et al (4992)
Pattern of flow-covered sand-fixing woodland and its windbreak effect	YANG Wenbin, DONG Huilong, LU Qi, et al (5000)
Evaluation of soil and water conservation capacity of different forest types in Dongling Mountain	MO Fei, LI Xuyong, HE Shuxia, et al (5009)
Changes in structural components and respiration rates of coarse woody debris at the initial decomposition stage for 11 temperate tree species	ZHANG Limin, WANG Chuankuan, TANG Yan (5009)
Characteristics of nutrient cycling in first and second rotations of Chinese fir plantations	TIAN Dalun, SHEN Yan, KANG Wenxing, et al (5025)
The optimal design of a connected nature reserve network	WANG Yicheng (5033)
Sub-areas compartmentalization of Changjiang Estuary based on the natural geographical characteristics	LIU Lusan, ZHENG Binghui, MENG Wei, et al (5042)
The environmental and economic influence of coal-electricity integration exploitation in the Xilingol League	WU Di, DAI Fangzhou, YAN Yan, et al (5055)
Review and Monograph	
The influence of diversity changes of ecological conditions on the survival of honey bees	HOU Chunsheng, ZHANG Xuefeng (5061)
Scientific Note	
The spatio-temporal change in the secondary production of macrozoobenthos in the intertidal zone of Jiaozhou Bay	ZHANG Chongliang, XU Binduo, REN Yiping, et al (5071)
The studying system construction of wetland parks	WANG Lilong, LU Lin (5081)
Ecological footprint analysis of a semi-arid grassland region facilitates assessment of its ecological carrying capacity: a case study of Xilinguole League	YANG Yan, NIU Jianming, ZHANG Qing, et al (5096)

2009 年度生物学科总被引频次和影响因子前 10 名期刊★

(源于 2010 年版 CSTPCD 数据库)

排序 Order	期刊 Journal	总被引频次 Total citation	排序 Order	期刊 Journal	影响因子 Impact factor
1	生态学报	11764	1	生态学报	1.812
2	应用生态学报	9430	2	植物生态学报	1.771
3	植物生态学报	4384	3	应用生态学报	1.733
4	西北植物学报	4177	4	生物多样性	1.553
5	生态学杂志	4048	5	生态学杂志	1.396
6	植物生理学通讯	3362	6	西北植物学报	0.986
7	JOURNAL OF INTEGRATIVE PLANT BIOLOGY	3327	7	兽类学报	0.894
8	MOLECULAR PLANT	1788	8	CELL RESEARCH	0.873
9	水生生物学报	1773	9	植物学报	0.841
10	遗传学报	1667	10	植物研究	0.809

★《生态学报》2009 年在核心版的 1964 种科技期刊排序中总被引频次 11764 次,全国排名第 1;影响因子 1.812,全国排名第 14;第 1—9 届连续 9 年入围中国百种杰出学术期刊;中国精品科技期刊

编辑部主任 孔红梅

执行编辑 刘天星 段 靖

生 态 学 报
(SHENGTAI XUEBAO)
(半月刊 1981 年 3 月创刊)
第 31 卷 第 17 期 (2011 年 9 月)

ACTA ECOLOGICA SINICA
(Semimonthly, Started in 1981)
Vol. 31 No. 17 2011

编 辑	《生态学报》编辑部 地址:北京海淀区双清路 18 号 邮政编码:100085 电话:(010)62941099 www.ecologica.cn shengtaixuebao@rcees.ac.cn	Edited by	Editorial board of ACTA ECOLOGICA SINICA Add:18, Shuangqing Street, Haidian, Beijing 100085, China Tel:(010)62941099 www.ecologica.cn Shengtaixuebao@rcees.ac.cn
主 编	冯宗炜	Editor-in-chief	FENG Zong-Wei
主 管	中国科学技术协会	Supervised by	China Association for Science and Technology
主 办	中国生态学会 中国科学院生态环境研究中心 地址:北京海淀区双清路 18 号 邮政编码:100085	Sponsored by	Ecological Society of China Research Center for Eco-environmental Sciences, CAS Add:18, Shuangqing Street, Haidian, Beijing 100085, China
出 版	科 学 出 版 社 地址:北京东黄城根北街 16 号 邮政编码:100717	Published by	Science Press Add:16 Donghuangchenggen North Street, Beijing 100717, China
印 刷	北京北林印刷厂	Printed by	Beijing Bei Lin Printing House, Beijing 100083, China
发 行	科 学 出 版 社 地址:东黄城根北街 16 号 邮政编码:100717 电话:(010)64034563 E-mail:journal@csppg.net	Distributed by	Science Press Add:16 Donghuangchenggen North Street, Beijing 100717, China Tel:(010)64034563 E-mail:journal@csppg.net
订 购	全国各地邮局	Domestic	All Local Post Offices in China
国外发行	中国国际图书贸易总公司 地址:北京 399 信箱 邮政编码:100044	Foreign	China International Book Trading Corporation Add:P. O. Box 399 Beijing 100044, China
广告经营 许 可 证	京海工商广字第 8013 号		



ISSN 1000-0933
CN 11-2031/Q

国内外公开发行

国内邮发代号 82-7

国外发行代号 M670

定价 70.00 元