

DOI: 10.20103/j.stxb.202207111974

王琳,周良俊,魏楷丽,张明海,张玮琪.穆棱林区野生东北马鹿种群冬季食物组成模式与植物代谢产物的关系.生态学报, 2023, 43(17): 7170-7180.

Wang L, Zhou L J, Wei K L, Zhang M H, Zhang W Q. Relationship between winter food composition pattern of red deer (*Cervus elaphus xanthopygus*) and plant secondary metabolites in Muling, China. Acta Ecologica Sinica, 2023, 43(17): 7170-7180.

穆棱林区野生东北马鹿种群冬季食物组成模式与植物代谢产物的关系

王 琳,周良俊,魏楷丽,张明海,张玮琪*

东北林业大学野生动物与自然保护地学院 哈尔滨 150040

摘要:高纬度地带,在冬季食物资源有限的环境中,野生大型有蹄类动物满足营养需求的同时,需要对植物中次生代谢产物进行平衡,回避有害物质并选择对机体有益的成分,从而形成特定的食物组成模式。以东北马鹿(*Cervus elaphus xanthopygus*)为研究对象,于2020年11月,在黑龙江穆棱东北红豆杉国家级自然保护区境内,采集东北马鹿粪便和植物样本。通过粪便显微分析法确定保护区内马鹿冬季食物组成,采用k-means聚类分析揭示马鹿冬季食物组成模式。应用广泛靶向代谢组技术对部分植物中次生代谢产物的含量进行全覆盖定性和相对定量检测,将食物组成与次生代谢产物数据整合,进行曼特检验(Mantel test)分析,以探究植物次生代谢产物对马鹿种群内食物组成模式的影响。结果表明,林区内马鹿种群冬季共采食30种植物,其中木本植物占92.48%;且种群内分别呈现出以东北红豆杉(*Taxus cuspidata*),簇毛槭(*Acer barbinerve*),毛榛子(*Corylus mandshurica*)为主要食物的不同食物组成模式。广泛靶向代谢组技术共检测出638种次生代谢产物,有25种代谢物与马鹿采食频率显著相关,其中多数萜类物质抑制马鹿采食,而鞣质类物质对马鹿的采食选择有一定的正向作用;Mantel test结果显示,上述25种物质中黄酮、鞣质、萜类化合物相对含量与不同马鹿个体食物组成显著相关,说明这些代谢物相对含量和性质的差异会造成种群内不同个体食物组成的差异,是种群内形成不同食物组成模式的原因之一。从植物次生代谢产物角度揭示了该地区东北马鹿种群冬季食物组成模式呈现差异的可能因素,为进一步研究大型有蹄类营养策略和植物化学防御关系提供基础依据。

关键词:东北马鹿;食物组成模式;植物次生代谢产物;广泛靶向代谢组

Relationship between winter food composition pattern of red deer (*Cervus elaphus xanthopygus*) and plant secondary metabolites in Muling, China

WANG Lin, ZHOU Liangjun, WEI Kaili, ZHANG Minghai, ZHANG Weiqi*

College of Wildlife and Protected Area, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

Abstract: In environments with limited winter food resources and high latitudes, large wild ungulates must balance toxic and harmful secondary metabolites in plants, avoid harmful substances, and choose beneficial components to form a specific food composition pattern. As the subject of this study, red deer (*Cervus elaphus xanthopygus*) was chosen. In this study, we collected fecal samples from wild red deer and their foraged plants by backtracking footprint chain and non-invasive sampling methods in the territory of Heilongjiang Muling Japanese Yew National Nature Reserve in November 2020. The winter food composition of red deer in the protected area was determined by fecal micro histological analysis, and the winter food composition pattern of red deer was uncovered through k-means cluster analysis. Contents of secondary

基金项目:国家自然科学基金项目(32071512,31500328);黑龙江省自然科学基金项目(QC2017011);中央高校基本科研项目(2572020BE02)

收稿日期:2022-07-11; **网络出版日期:**2023-04-28

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: zhangweiqi@nefu.edu.cn

metabolites of some plant species were detected qualitatively and quantitatively using a widely targeted metabolome technology, and statistical analysis was performed to investigate the effects of plant secondary metabolites on the food composition pattern of red deer population. Through the analysis of fecal residue, it was determined that the red deer population in the reserve fed on 30 plant species during the winter, among which woody plants accounted for 92.48%. Three different food composition patterns dominant by *Taxus Cuspidata*, *Acer Barbinerve* and *Corylus mandshurica* as the main food found. A total of 638 secondary metabolites were detected using widely targeted metabolome technology with broad targeting. 25 of them were significantly correlated with red deer feeding frequency. Most of terpenoids inhibited feeding of red deer, whereas tannins had a certain positive effect on feeding selection of red deer. The results of Mantel test revealed that the relative contents of some flavonoids, tannins and terpenoids in the 25 substances above were significantly correlated with the individual food composition of different red deer, to illustrate these metabolites relative content and nature of the differences will lead to different populations in different individual differences in food composition, population is in one of the reasons to form different patterns of the food composition. The flavonoids mainly affected the red deer population feeding on *Taxus Cuspidata*, while the tannins and terpenoids mainly affected the red deer population feeding on *Corylus mandshurica* and *Acer Barbinerve*. This study reveals the possible factors for the differences in winter food composition patterns of red deer populations in this region from the perspective of plant secondary metabolites, and provides a foundation for further research on the relationship between trophic strategies and chemical defense of large ungulates.

Key Words: red deer; food composition pattern; plant secondary metabolites; widely targeted metabolome

动物通过取食和消化食物获得维持生命活动的营养物质和能量。广食性大型有蹄类动物的食物组成复杂,是各种营养、非营养物质和生态因子综合作用的结果^[1-2]。植物中维持生命活动的蛋白质、脂肪、可消化纤维素等营养物质,以及植物化学防御所产生的次生代谢产物即非营养物质都是影响植食性动物食物组成模式的重要因素^[3-4]。

植物次生代谢产物(PSMs)是由初生代谢产物在植物组织中通过一系列代谢途径衍生而来的、非植物生长发育所必需的小分子化合物,是植物在长期生长进化过程中与环境相互作用的适应性结果^[5-7]。根据代谢物的化学结构及合成途径主要可分为萜类、酚类和含氮化合物^[8-9],代谢物具有多种理化作用,被认为是防止植食性动物过度采食的防御机制,例如,某些次生代谢产物能够降低植物适口性或抑制植食性动物的生理功能^[10-11],从而影响种群内不同个体,呈现出特定的食物组成模式。

东北马鹿(*Cervus elaphus xanthopygus*)为国家Ⅱ级重点保护动物,属于典型的广食性食草动物,在对次生代谢产物的处理方式上,与专性食草动物从生理上形成特定的生物转化途径不同^[12],广食性食草动物会通过调整食物单次摄入量、摄食时间间隔等方式改变取食策略,以减少或避免采食过量有毒次生代谢产物^[13-15]。分布于黑龙江穆棱红豆杉自然保护区的野生东北马鹿,冬季主要以木本植物嫩枝为食^[16-17],而北方冬季低温寒冷,食物可获得性和质量降低,营养限制严重,使动物处于食物缺乏的环境。为保证种群中多数个体达到营养需求,种群内可能会形成某种食物组成模式。同时,植物中高含量代谢产物会直接影响动物对食物的利用,此时,动物对植物次生代谢产物的摄入与平衡在冬季便显得尤为重要^[18]。植物在不同生理时期能合成数百甚至上千种代谢物,以往在次生代谢产物和动物营养相关的研究中,主要关注单宁、黄酮等大类物质总量对食草动物的影响^[19-20],而植物中其他类别次生代谢产物,以及各物质的相对含量如何影响广食性食草动物食物组成模式的相关研究尚未得到充分关注。

鉴于此,本研究对分布于黑龙江穆棱林区野生东北马鹿种群冬季食物组成进行研究,通过结合广泛靶向代谢组技术^[21],广泛覆盖马鹿采食植物中所有次生代谢产物、并测定每种物质的相对含量,揭示分布于黑龙江穆棱林区野生东北马鹿种群内的食物组成模式,以及次生代谢产物在不同植物类别下的差异情况,探讨各类次生代谢产物与马鹿种群中不同食物组成模式的关系,本研究将为植食性哺乳动物与植物相互作用关系的

研究和植物化学防御理论的验证与延伸提供基础。

1 研究方法

1.1 研究地区

黑龙江穆棱国家级红豆杉自然保护区(130°0′—130°28′E;43°49′—44°6′N)位于黑龙江省南部牡丹江市境内,总面积约356.48km²,保护区地貌以山地为主,呈条带状分布,海拔在500—900m之间,属于典型的温带大陆性季风气候,四季温差较大,年平均气温约-2℃。林区内植被主要是以红松(*Pinus koraiensis*)、东北红豆杉(*Taxus cuspidata*)、红皮云杉(*Picea koraiensis*)、落叶松(*Larix gmelinii*)、白桦(*Betula platyphylla*)、紫椴(*Tilia amurensis*)、山杨(*Populus davidiana*)、蒙古栎(*Quercus mongolica*)等为优势种的针阔混交林,同时也包括卫矛属、榛属等丰富的灌丛资源。研究地区复杂的植被资源造就了野生动物种类的多样性,代表动物除东北马鹿外,还有东北虎(*Panthera tigris altaica*)、野猪(*Sus scrofa*)、狍(*Capreolus pygargus*)、黄喉貂(*Martes flavigula*)、黑熊(*Ursus thibetanus*)、长尾林鸮(*Strix uralensis*)、狗獾(*Meles leucurus*)等^[22]。

1.2 粪便和植物样品采集与装片制备

2020年11月,在黑龙江穆棱国家级东北红豆杉保护区进行野外样品采集,根据马鹿分布及活动情况(马鹿的日活动半径为1.5—2.0km)^[23],设计间隔为2km以上的不同采样区域,在不同区域上寻找新鲜马鹿足迹链,发现足迹链后,根据足迹周围雪壳软硬或松弛情况判断其新鲜程度,越软或雪被越松,表示足迹链新鲜。根据雪地足迹的步距及蹄印大小区别马鹿与其他有蹄类动物,马鹿足迹行距较宽,其蹄印相较于其他鹿科动物更大,但后蹄瓣较小并呈圆形。沿新鲜足迹链进行反向跟踪,通过非损伤性取样方法采集粪样,每堆粪便采集约30粒,当采集1—2堆时返回,寻找新的足迹链再跟踪,使粪便样本尽可能代表不同个体(图1)。佩戴聚乙烯(PE)手套采集粪便并置于封口袋中,并将粪便样品尽快带回实验室置于-20℃冰箱保存。

在跟踪马鹿足迹链时,以有啃食痕迹的植物为中心设置10m×10m样方,采集样方内未被啃食过的植物枝条。采集木本植物时选择2m以下当年生枝条的嫩茎,落叶和禾本科植物选择雪被以上部分。将植物样品分成两部份,一份装入牛皮纸袋中用于马鹿食性分析实验;另一份装入离心管中,并用液氮处理,以淬灭植物次生代谢过程,后置于-80℃冰箱保存,用于植物次生代谢产物测定。

野外采集的动物粪便与植物样本烘干至恒重,分别粉碎、研磨,再用10%的次氯酸钠溶液浸泡,洗涤后制备装片,具体样品装片制备及拍摄法参照周良俊等^[24]。

1.3 植物次生代谢产物含量测定

根据食物组成的结果,且为了保证广泛靶向代谢组测定代谢物的准确性,选择啃食痕迹样方内,存在3株及以上的部分植物样本进行次生代谢产物的测定。将用液氮处理过的植物样品进行真空冷冻干燥处理,并研磨成粉末状,称取100mg粉末溶于1.2mL 70%甲醇提取液中,进行6次涡旋振荡,每次间隔30min,以提高提取率;然后置于4℃冰箱过夜后再离心10min,取上清液用0.22μm微孔滤膜进行过滤,并保存于进样瓶中,后续的超高效液相色谱串联质谱(UPLC-MS/MS)检测与分析委托迈维生物技术有限公司进行。

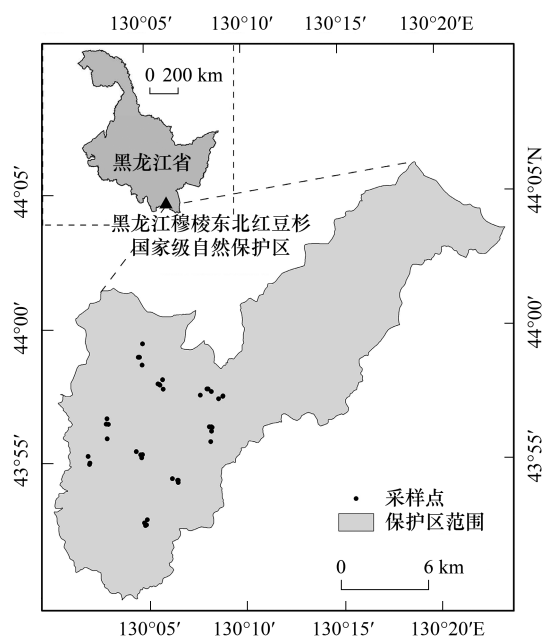


图1 研究区域地理位置及采样点示意图

Fig.1 Map of the study area and sampling sites

1.4 数据处理及统计分析

采用频率转换法分析粪便显微装片,先获得每个粪样中每种植物可辨认角质碎片出现频率 F ,通过公式: $F = 100(1 - e^{-Di})^{[25]}$,计算出每种植物平均密度(Di),再通过相对密度(RD) = $Di / \sum Di$ ($\sum Di$ 指各种植物可辨认角质碎片之和)转换为相对密度 RD 。通过 k-means^[26]对食物组成数据进行聚类,以分析东北马鹿种群内不同个体冬季食物组成的相似性及差异性。

基于自建数据库(MWDB),根据二级谱信息对物质进行定性;利用多反应监测模式(MRM)对物质进行定量。采用主成分分析(PCA)与层次聚类分析(HCA),判断不同植物的次生代谢物相对含量差异及相似情况。根据多变量分析的正交偏最小二乘法判别分析(OPLS-DA)模型的重要性投影(VIP),同时结合单变量分析的差异倍数(FC)筛选出不同比较组之间的差异代谢物。

将 11 种植物中次生代谢产物相对含量原始数据进行对数转换后,与马鹿对相应植物的采食频率进行 Spearman 相关检验,分析各代谢物与马鹿种群食物组成的关系。再通过 Mantel test 检验^[27]进一步分析各代谢物相对含量差异对种群内不同个体食物组成模式的影响。

2 结果

2.1 穆棱东北马鹿冬季食物组成

2020 年 11 月,于黑龙江穆棱国家级红豆杉自然保护区,共采集粪便样品 41 份,通过镜检,辨认植物组织碎片 12300 个,发现在该时间段下穆棱野生东北马鹿采食 30 种植物。其中,东北红豆杉(18.08%)等针叶乔木占比 18.80%;簇毛槭(*Acer barbinerve*) (10.34%)、山杨(7.91%)、榆树(*Ulmus pumila*) (7.39%)、白桦(6.73%)、蒙古栎(6.49%)、紫椴(4.21%)等阔叶乔木共占 55.12%;灌木植物占比 18.56%,主要包括毛榛子(*Corylus mandshurica*) (10.73%)、瘤枝卫矛(*Euonymus verrucosus*) (2.82%)、忍冬(*Lonicera maackii*) (2.18%)等。草本植物在马鹿冬季食物组成中占 7.44%,包括粗茎鳞毛蕨(*Dryopteris crassirhizoma*) (4.02%)、木贼(*Equisetum ramosissimum*) (3.07%)等(图 2)。其中臭冷杉(*Abies nephrolepis*)占比过少,不足 0.02%,因此并未在图 2 中体现。穆棱东北马鹿冬季食物组成以木本植物为主(占比 92.48%),而对草本植物采食较少。

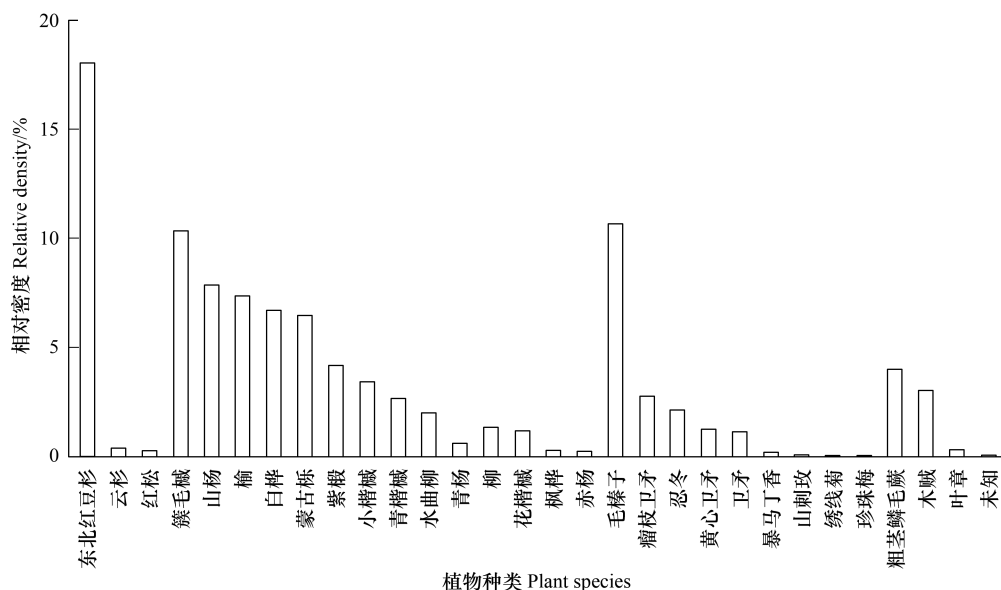


图 2 穆棱东北马鹿冬季食物组成

Fig.2 Food composition of red deer in Muling in winter

将 41 份马鹿粪便样本的食物组成数据进行聚类分析,结果显示,样本聚类分为三组,其中第 1 组东北红

豆杉的聚类均值最高为 1.1895, 包括 14 个样本; 毛榛子与簇毛槭分别在第 2、3 组中聚类均值最高, 各为 0.9901、1.0312, 分别包括 12 与 15 个样本; 各组内样本食物组成相似, 组间差异较大, 表明三组马鹿群体分别呈现出以东北红豆杉, 毛榛子和簇毛槭为主要食物的不同取食模式(图 3)。

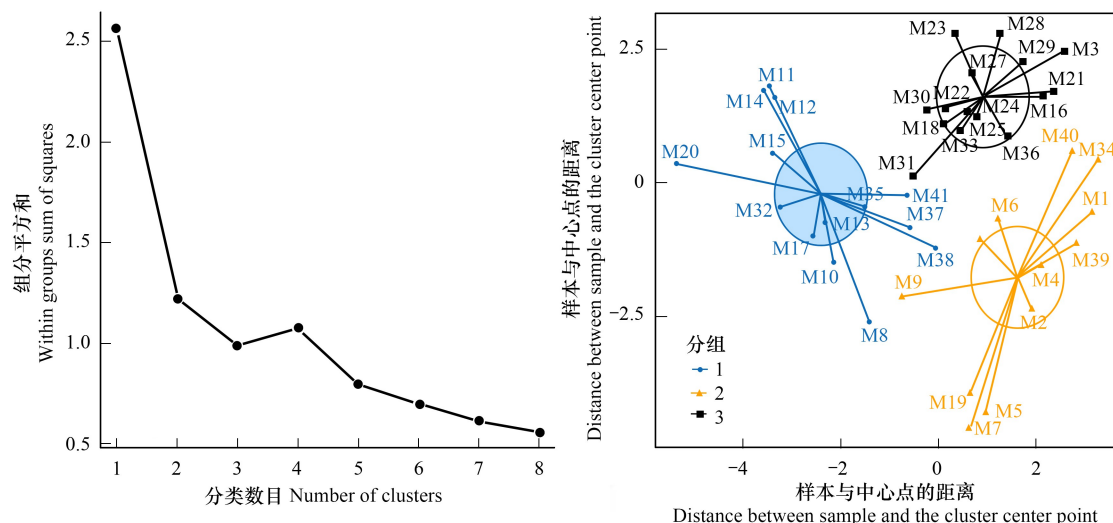


图 3 东北马鹿冬季食物组成 k-means 聚类图

Fig.3 K-means clustering of the food composition of the red deer in winter

M1,2,3...41: 马鹿个体粪便样本 Red deer faeces sample

2.2 植物次生代谢产物成分分析

根据马鹿的食物组成, 将 11 种符合次生代谢产物采样测定条件的植物分为针叶乔木、落叶乔木、灌木。包括红豆杉、簇毛槭、毛榛子, 山杨, 取食比例均大于 5%; 紫椴、瘤枝卫矛、卫矛 (*Euonymus alatus*), 取食比例大于 1% 但不足 5%; 以及取食比例小于 1% 的暴马丁香 (*Syringa reticulata*)、赤杨 (*Alnus japonica*)、红松、珍珠梅 (*Sorbaria sorbifolia*)。通过广泛靶向代谢组学对 11 种植物中次生代谢产物相对含量进行分析, 共鉴定出 638 种代谢物, 可将其分为 8 个大类, 包括酚酸类 173 种, 黄酮类 196 种, 生物碱 22 种, 鞣质 29 种, 醌类物质 5 种, 木脂素和香豆素 70 种, 萜类物质 111 种, 以及其他类别的物质 32 种。

对植物样品中次生代谢产物相对含量进行主成分分析 (PCA), 图 4 中, PC1、PC2 分别表示第一、二主成分, 除落叶乔木山杨外, 其他植物距离较近, 说明物种间代谢物成分差异变化较小; 而山杨与其他物种距离最远, 说明山杨与其他植物之间代谢成分存在较大差异。

采用层次聚类分析 (HCA) 进一步分析代谢物的含量, 对植物物种与代谢物相对含量分别聚类, 结果显示, 东北红豆杉与红松两种针叶乔木聚在一起, 瘤枝卫矛和卫矛两种同一科属的灌木聚在一起, 说明其代谢物表达模式一致性较高, 相对含量较为相似; 山杨与落叶乔木组内其他植物相距较远, 这一结果与 PCA 得到的结果一致, 说明山杨与其他植物代谢物成分存在较高异质性; 图中颜色越深, 表示代谢物相对含量越高 (图 5)。

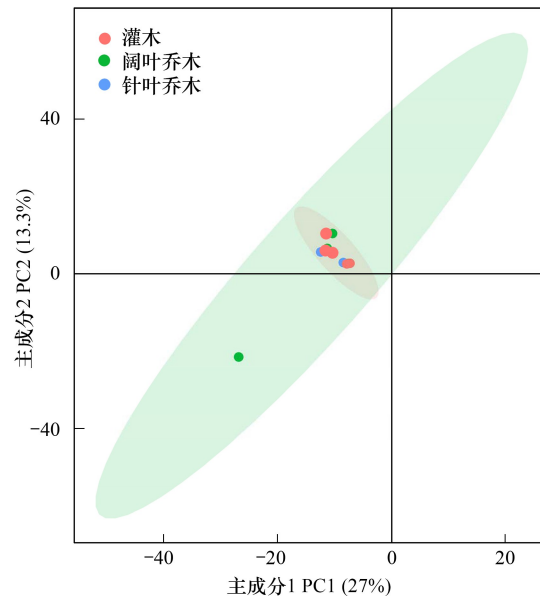


图 4 11 种马鹿采食植物中代谢物的主成分分析

Fig.4 Principal component analysis of metabolites in 11 species of red deer foraging plants

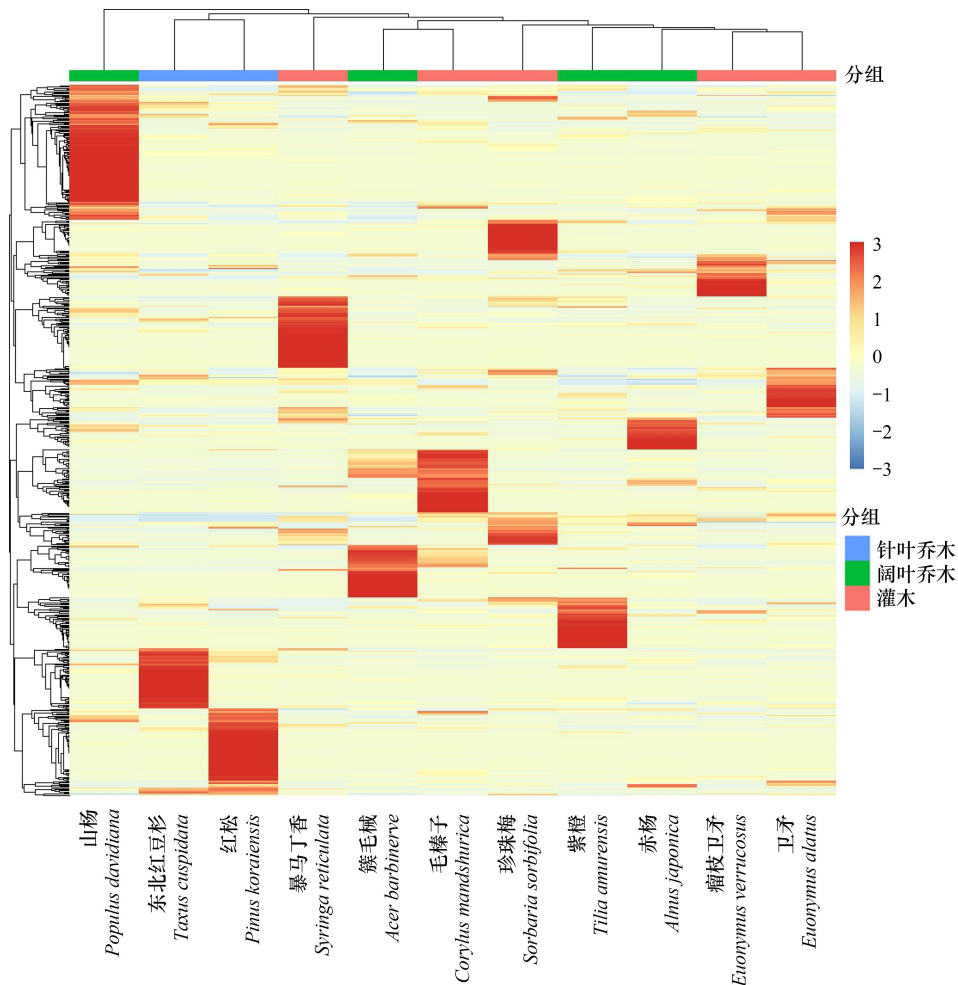


图5 11种马鹿采食植物中代谢物的层次聚类分析

Fig.5 Hierarchical clustering analysis of metabolites in 11 species of red deer foraging plants

根据VIP值与差异倍数结合,将不同类别植物进行两两比较,筛选不同比较组间的差异代谢物,结果表明,与针叶乔木相比,阔叶乔木与灌木分别具有187和208种差异代谢物,其中分别有89和120种代谢物下调,表示这些代谢物在针叶乔木中相对含量较高;阔叶乔木与灌木之间也有208种差异代谢物,其中68种上调,140种下调,表示68种代谢物在灌木中相对含量较高,140种代谢物在阔叶乔木中相对含量较高(图6)。

2.3 植物次生代谢物相对含量与食物组成的关系

Spearman相关性检验结果表明,有25种代谢物与马鹿种群对植物的取食频率显著相关,说明植物中代谢物相对含量会影响种群整体对植物的采食。相关系数绝对值越接近1,相关性越强,反之则越弱。25种与之具有相关关系的代谢物中,萜类物质有14种(表1),占比56%,除断马钱子苷半缩醛内酯这一物质外,均与取食频率呈现显著的负相关,即代谢物在植物中的含量较高时,马鹿对该植物的取食频率越低。

将不同马鹿粪便样本食物组成与植物次生代谢产物相对含量进行Mantel test分析,进一步分析代谢物含量对种群内不同个体的影响。结果显示,不同个体食物组成相关性聚类结果相似,且部分代谢物与个体食物组成显著相关($P < 0.05$)(图7)。图中三角阵位置为马鹿群体间食物组成相关性热图,颜色越深表示彼此相关性越强,即具有类似的食物组成模式,如样本M11—15,热图色块颜色较深,彼此相关性较强,且在食物组成上均以东北红豆杉为主要食物,这与k-means聚类结果一致,说明这部分马鹿群体表现出以东北红豆杉为主要食物的食物组成模式。图中不同颜色连线表示各代谢物与不同个体食物组成的相关性情况,其中酚酸、

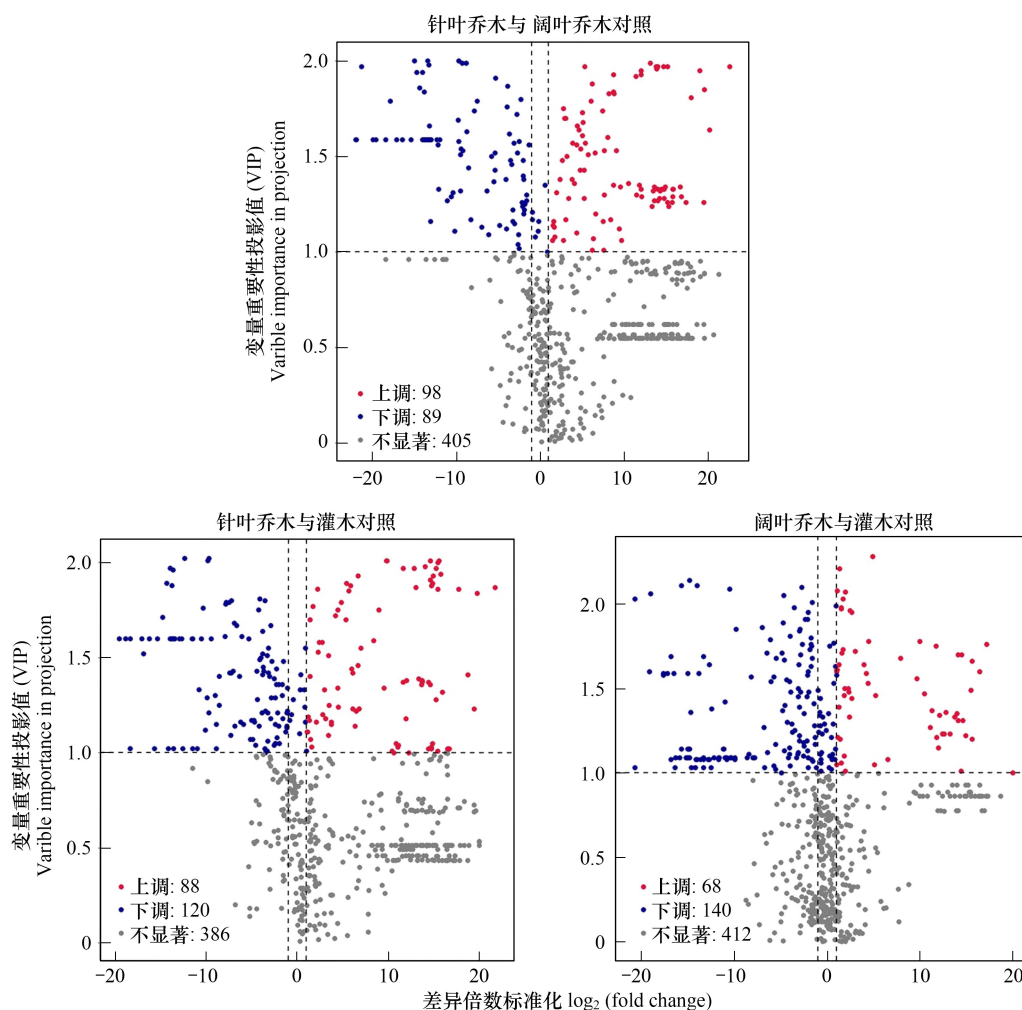


图 6 不同类别植物差异代谢物火山图

Fig.6 Volcanoes of differential metabolites of different plant classes

上调下调后面的数字是代谢物的种数,如 68 代表有 68 种代谢物上调;横坐标中 fold change (FC) 表示某代谢物在两组样品中相对含量差异倍数; $\log_2$ FC 表示差异倍数对数值进行标准化

木脂素、生物碱类物质与马鹿群体食物组成的相关性并不显著 ($P \geq 0.05$),说明这几类物质不是影响个体食物组成、造成马鹿群体间食物组成模式差异的主要原因;而部分鞣质(单宁)、黄酮、萜类物质相对含量与不同群体的食物组成的相关性达到显著水平 ($P < 0.05$),且这种相关性有一定的差异,其中黄酮类物质与部分以东北红豆杉为主要食物的马鹿群体的食物组成显著相关;而鞣质、萜类物质含量与部分以簇毛槭、毛榛子为主要食物的群体的食物组成显著相关,说明上述代谢物性质与含量的差异会影响个体的食物组成,从而造成种群内呈现不同的食物组成模式。

3 讨论

3.1 东北马鹿冬季食物组成

冬季是马鹿食物资源匮乏,食物质量下降的时期,早期研究表明,食草动物在面临食物资源水平下降时,会使其食性逐渐趋于泛化^[28]。2020 年冬季穆棱东北马鹿取食 30 种植物,马鹿对木本植物有较强的选择性,占其食物组成 90%以上,主要包括东北红豆杉、簇毛槭、毛榛子、蒙古栎、白桦、山杨等,与以往穆棱东北马鹿冬季食物组成研究结果相似^[14,29],这反映了马鹿在冬季时期的主要食物种类较为稳定。这种食物组成与保

表 1 与马鹿采食频率有相关性的 25 种代谢物质分类及其组间差异

Table 1 Classification of 25 metabolites correlated with feeding frequency of red deer and their differences between groups

物质 Compounds	分类 Class	针叶与阔叶对照 Coniferous vs Deciduous	针叶与灌木对照 Coniferous vs Shrub	阔叶与灌木对照 Deciduous vs Shrub
2-羟基齐墩果酸 2-Hydroxyoleanolic acid	萜类	FALSE	FALSE	up
圣草酚-3'-O-葡萄糖苷 Eriodictyol-3'-O-glucoside	黄酮	FALSE	down	FALSE
2 α -羟基熊果酸 2 α -Hydroxyursolic acid	萜类	FALSE	FALSE	FALSE
杨梅素-3-O-半乳糖苷-3'-O-鼠李糖苷 Myricetin-3-O-galactoside-3'-O-rhamnoside	黄酮	FALSE	FALSE	down
鞣料云实素 Corilagin	鞣质	FALSE	FALSE	FALSE
2 α ,19 α -二羟基-3-氧熊果-12-烯-28-酸 2 α ,19 α -Dihydroxy-3-oxours-12-en-28-oic acid	萜类	FALSE	FALSE	FALSE
积雪草酸 Asiatic acid	萜类	FALSE	FALSE	up
薄荷烯醇 Piperitol	木脂素和香豆素	FALSE	FALSE	up
女贞苷 Ligstroside	萜类	FALSE	FALSE	up
异女贞苷 Isoligustroside	萜类	FALSE	FALSE	up
咖啡酸乙酯 Ethyl caffeate	酚酸类	up	FALSE	down
短叶苏木酚酸 Brevifolin carboxylic acid	酚酸类	FALSE	FALSE	FALSE
秦皮啶-8-O-葡萄糖苷 Fraxidin-8-O-glucoside	木脂素和香豆素	FALSE	FALSE	up
野蔷薇酸 Rosamultic acid	萜类	FALSE	FALSE	up
3-O-反式-香豆酰-委陵菜酸 3-O-trans-p-Coumaroyltormentic acid	萜类	FALSE	FALSE	up
咖啡酰山楂酸 Caffeoylhawthorn acid	萜类	FALSE	FALSE	up
3-O-顺式-香豆酰-委陵菜酸 3-O-cis-Coumaroyltormentic acid	萜类	FALSE	FALSE	up
3-O-反式阿魏酰蔷薇酸 3-O-Trans-feruloyl euscaphic acid	萜类	FALSE	FALSE	up
断马钱子苷半缩醛内酯 Vogeloside	萜类	FALSE	FALSE	down
正苄基甲酰胺 N-benzylformamide	生物碱	FALSE	FALSE	FALSE
4-羟基-5-(2-氧-1-吡咯烷基)苯甲酸 4-Hydroxy-5-(2-oxo-1-pyrrolidinyl) benzoic acid	生物碱	FALSE	FALSE	FALSE
N-乙酰-5-羟基色胺 N-Acetyl-5-hydroxytryptamine	生物碱	FALSE	FALSE	FALSE
蔷薇酸 Euscaphic acid	萜类	FALSE	up	up
1-羧基-泰国树脂酸 1-Oxo-Siaresinolic acid	萜类	FALSE	FALSE	FALSE

表中 up、down 分别表示该差异代谢物在该分组比较中相对含量上调、下调;FALSE 表示分组中该种代谢物没有显著差异

护区以针阔混交林为主的植被类型相符合。产生这种食物组成的原因,一方面,林区内冬季积雪严重,草本植物被覆盖,阻碍了动物对草本植物的利用,而毛榛子、簇毛槭、白桦等木本植物在林区内可获得性会相对较高;

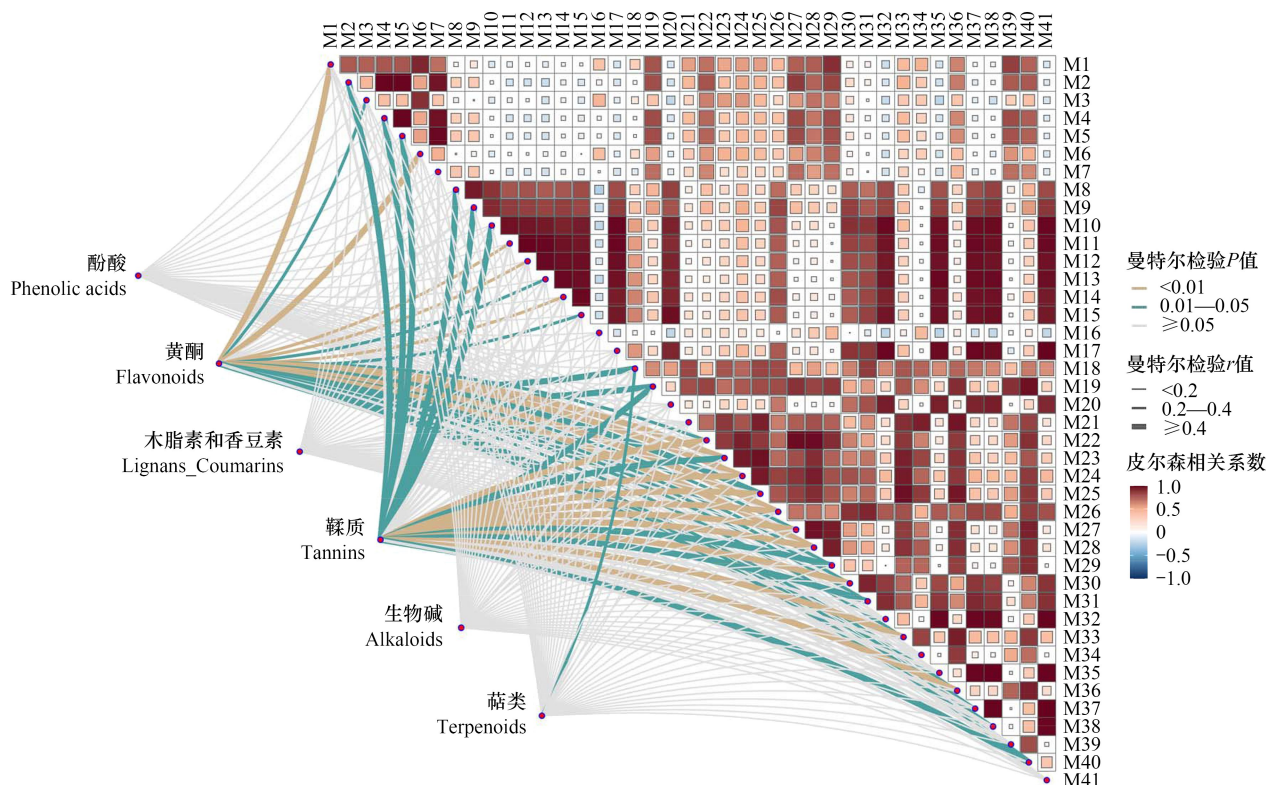


图7 不同类别下 25 种代谢物与各马鹿粪便样本食物组成相关性

Fig.7 Correlation of 25 metabolites with the food composition of each red deer fecal sample under different categories

另一方面,林区内狍、梅花鹿等植食性动物与马鹿的食物组成有一定的重叠性^[23,30],存在对有限食物资源的竞争,并且马鹿属于混饲者,具有更高的消化率,使其能够靠采食纤维含量较高的木本植物满足生存需求^[31-32];同时,东北红豆杉幼苗木质化程度较低^[13],并且冬季时期针叶树种中粗蛋白、粗脂肪等营养成分相对较高,更容易满足动物的营养需求^[14,33-34],由此东北红豆杉、毛榛子、簇毛槭等木本植物成为马鹿冬季的主要食物。

3.2 植物次生代谢产物对东北马鹿食物组成模式影响

植食性动物采食更多种类的食物,一方面为了维持正常生命活动以实现更好地营养平衡,另一方面稀释食物成分中的一些有毒的次生代谢物质^[35]。有研究表明一些萜类物质会抑制动物激素分泌、动物个体的生长以及消化道微生物的活力;另外,一些植物中的萜类物质可能会具有刺激气味,从而可阻止植食性动物的取食^[36]。本研究检测出的物质中,2 α -羟基熊果酸和 2-羟基齐墩果酸均属于三萜类化合物,是一种 α -葡萄糖苷酶抑制剂,摄入过量会抑制体内碳水化合物的分解,从而可能导致代谢问题^[37],并且这两种物质在暴马丁香和珍珠梅等灌木植物中相对含量较高,因此马鹿可能会为避免过量摄入该物质而减少对这两种植物的取食,从而使其在食物组成中占比较低。

酚类化合物会与蛋白质结合,降低酶活性,导致蛋白质的可利用性降低,影响动物体的消化能力,但由于代谢物的理化性质、浓度以及动物体对代谢物反应的不同,代谢物也可能表现出对动物体生长发育的促进作用^[38]。例如,鞣料云实素,鞣质类物质,具有抗氧化、保护肝脏、抑制金黄色葡萄球菌等多种理化作用^[39],这一物质在簇毛槭、毛榛子中相对含量较高,同时这两种植物在马鹿食物组成中均占有较高比例(均大于 10%),可见该物质对马鹿采食存在一定的正向作用。咖啡酸乙酯,一种天然酚酸类物质,具有调节肠道微生物群的组成,影响微生物活性,抗纤维化的能力^[40];其相对含量在山杨中最高,由此可能促进马鹿对山杨的采食,使其成为马鹿冬季主要食物之一。此外,黄酮类物质花旗松素-3'-O-葡萄糖苷和杨梅素-3-O-半乳糖苷-3'-

O-鼠李糖苷具有一定的抗炎、抗自由基防止器官损伤的作用^[41-42],并且两种物质在紫椴和山杨中含量较高,从而可能影响马鹿对其的采食频率。

本研究结合 Mantel test 分析,进一步明确了不同种类代谢物与种群内形成的不同食物组成模式具有一定的相关性,其中鞣质、萜类物质主要影响以簇毛槭,毛榛子为主要食物的群体;黄酮类物质对以东北红豆杉、紫椴、山杨等为主要食物的食物组成模式的群体影响较大,由于各次生代谢物理化性质与含量的差异,会造成动物体消化及代谢等生理机能差异,并且种群中不同个体对食物信息的处理以及对次生代谢产物的接受程度也存在区别^[43],基于这些个体差异,使种群内不同个体面对外界环境干扰,可能会选择在满足自身营养需求的同时摄入更多对机体有益的物质以抵御冬季极端天气,从而导致种群内呈现出不同的食物组成模式。

4 结论

研究结果显示,冬季穆棱东北马鹿种群内呈现出不同的食物组成模式,分别以东北红豆杉,簇毛槭,毛榛子为主要食物。马鹿采食植物中除山杨外,各植物中代谢物成分含量差异变化较小;马鹿食物中次生代谢物种类较多,其中 25 种代谢物与马鹿采食频率具有相关性,萜类物质占比较大,多数与马鹿采食频率呈负相关关系,且大部分在灌木植物中含量较高。其中鞣质类物质主要影响以簇毛槭,毛榛子为主要食物的马鹿群体,是使其在食物组成模式上与其他群体存在差异的原因之一;而黄酮类物质对呈现以东北红豆杉、紫椴等为主要食物的食物组成模式的马鹿群体影响较大。综上,马鹿取食受多种因素影响,在不同成分作用下使种群呈现出不同的取食模式,以满足冬季极端环境下的越冬需求。

参考文献 (References):

- [1] Scott L L, Provenza F D. Variation in food selection among lambs; effects of basal diet and foods offered in a meal. *Journal of Animal Science*, 1999, 77(9): 2391-2397.
- [2] Wam H K, Felton A M, Stolter C, Nybakken L, Hjeljord O. Moose selecting for specific nutritional composition of birch places limits on food acceptability. *Ecology and Evolution*, 2018, 8(2): 1117-1130.
- [3] Felton A M, Felton A, Raubenheimer D, Simpson S J, Krizsan S J, Hedwall P O, Stolter C. The nutritional balancing act of a large herbivore: an experiment with captive moose (*Alces alces* L.). *PLoS One*, 2016, 11(3): e0150870.
- [4] Raubenheimer D, Simpson S J. Nutritional Pharmacology: doses, nutrients, toxins, and medicines. *Integrative and Comparative Biology*, 2009, 49(3): 329-337.
- [5] Iason G. The role of plant secondary metabolites in mammalian herbivory: ecological perspectives. *Proceedings of the Nutrition Society*, 2005, 64(1): 123-131.
- [6] 冯佳楠, 于晶晶, 张明海. 植食性动物与植物互作关系研究进展. *西部林业科学*, 2022, 51(2): 131-137.
- [7] Borchard F, Berger H J, Bunzel-Drüke M, Fartmann T. Diversity of plant-animal interactions: possibilities for a new plant defense indicator value? *Ecological Indicators*, 2011, 11(5): 1311-1318.
- [8] 孙立影, 于志晶, 李海云, 李俊波, 刘洪章, 林秀峰, 马瑞. 植物次生代谢物研究进展. *吉林农业科学*, 2009, 34(4): 4-10.
- [9] 陈晓亚, 刘培, 孟玉玲, 李军, 梁婉琪, 王小红. 植物的次生代谢. *科学*, 1996, 48(5): 37-39+3.
- [10] Bergvall U A, Leimar O. Plant secondary compounds and the frequency of food types affect food choice by mammalian herbivores. *Ecology*, 2005, 86(9): 2450-2460.
- [11] 陈亮峰, 钟文勤, 王德华. 植物次生代谢物对植食性哺乳动物营养和生理生态特征的影响. *兽类学报*, 2006, 26(1): 68-75.
- [12] Torregrossa A M, Azzara A V, Dearing M D. Testing the diet-breadth trade-off hypothesis: differential regulation of novel plant secondary compounds by a specialist and a generalist herbivore. *Oecologia*, 2012, 168(3): 711-718.
- [13] Torregrossa A M, Dearing M D. Nutritional toxicology of mammals: regulated intake of plant secondary compounds. *Functional Ecology*, 2009, 23(1): 48-56.
- [14] Sorensen J S, McLister J D, Dearing M D. Novel plant secondary metabolites impact dietary specialists more than generalists (*Neotoma* spp.). *Ecology*, 2005, 86(1): 140-154.
- [15] 王元素, 洪绶曾, 王堃. 植物次生化合物光谱分析预测动物采食量研究进展. *光谱学与光谱分析*, 2007, 27(9): 1770-1774.
- [16] 冯源. 黑龙江穆棱林区东北马鹿(*Cervus elaphus xanthopygus*)冬季营养策略研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2018.
- [17] 钟林强. 同域分布马鹿与梅花鹿采食和营养策略及采食生境评价[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2020.
- [18] Wang P, Vassão D G, Raguschke B, Furlong M J, Zalucki M P. Balancing nutrients in a toxic environment: the challenge of eating. *Insect Science*, 2022, 29(1): 289-303.

- [19] 沈广爽. 西藏马鹿草青期食物组成及采食与营养适应对策的研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2009.
- [20] Tseu R J, Junior F P, Carvalho R F, Sene G A, Tropaldi C B, Peres A H, Rodrigues P H M. Effect of tannins and monensin on feeding behaviour, feed intake, digestive parameters and microbial efficiency of nellore cows. *Italian Journal of Animal Science*, 2020, 19(1): 262-273.
- [21] Sawada Y, Akiyama K, Sakata A, Kuwahara A, Otsuki H, Sakurai T, Saito K, Hirai M Y. Widely targeted metabolomics based on large-scale MS/MS data for elucidating metabolite accumulation patterns in plants. *Plant and Cell Physiology*, 2009, 50(1): 37-47.
- [22] 田新民, 陈红, 钟林强, 黄海娇, 刘小慧, 张子栋, 杨孟平, 周绍春. 黑龙江省老爷岭南部穆稜林区马鹿种群分布数量及生境适宜性评价. *生态学报*, 2022, 42(14): 5980-5989.
- [23] 朱明月, 杨森, 张玮琪, 张明海. 黑龙江穆稜东北红豆杉自然保护区马鹿与狍冬季食性组成的比较. *东北林业大学学报*, 2019, 47(5): 100-104.
- [24] 周良俊, 王琳, 魏楷丽, 张明海, 张玮琪. 内蒙古森林—草原交错带中野生东北马鹿冬季食物组成模式. *兽类学报*, 2022, 42(3): 240-249.
- [25] Johnson Mark K. Frequency sampling for microscopic analysis of botanical compositions. *Journal of Range Management*, 1982, 35(4): 541.
- [26] MacQueen J. Some methods for classification and analysis of multivariate observations. *Berkeley Symposium on Mathematical Statistics and Probability*, 1967: 281-297.
- [27] Mantel N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, 1967, 27(2): 209-220.
- [28] Nudds T D. Forage “preference”: theoretical considerations of diet selection by Deer. *Journal of Wildlife Management*, 1980, 44(3): 735.
- [29] 黄晨. 黑龙江穆稜和内蒙古高格斯台自然保护区马鹿冬季营养策略比较研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2015.
- [30] 黄晨, 张玮琪, 张明海. 黑龙江省完达山东部地区马鹿冬季取食对策研究. *野生动物学报*, 2014, 35(2): 129-134.
- [31] Spitzer R, Felton A, Landman M, Singh N J, Widemo F, Crooms J P G M. Fifty years of European ungulate dietary studies: a synthesis. *Oikos*, 2020, 129(11): 1668-1680.
- [32] Spitzer R, Coissac E, Felton A, Fohringer C, Juvany L, Landman M, Singh N J, Taberlet P, Widemo F, Crooms J P G M. Small shrubs with large importance? Smaller Deer may increase the moose-forestry conflict through feeding competition over *Vaccinium* shrubs in the field layer. *Forest Ecology and Management*, 2021, 480: 118768.
- [33] Jarmila K, Miroslava B, Pavel Š, Marco H. Feeding patterns of red deer *Cervus elaphus* along an altitudinal gradient in the Bohemian Forest: effect of habitat and season. *Wildlife Biology*, 2010, 16(2): 173-184.
- [34] Capoani L. Variations in nutritional content of key ungulate browse species in Sweden, 2019.
- [35] Shipley L A, Blomquist S, Danell K. Diet choices made by free-ranging moose in northern Sweden in relation to plant distribution, chemistry, and morphology. *Canadian Journal of Zoology*, 1998, 76(9): 1722-1733.
- [36] 付佳, 王洋, 阎秀峰. 萜类化合物的生理生态功能及经济价值. *东北林业大学学报*, 2003, 31(6): 59-62.
- [37] He Q Q, Yang L, Zhang J Y, Ma J N, Ma C M. Chemical constituents of gold-red apple and their α -glucosidase inhibitory activities. *Journal of Food Science*, 2014, 79(10): C1970-C1983.
- [38] Yuan Y F, Li L S, Zhao J F, Chen M. Effect of tannic acid on nutrition and activities of detoxification enzymes and acetylcholinesterase of the fall webworm (Lepidoptera: Arctiidae). *Journal of Insect Science*, 2020, 20(1): 8.
- [39] Li X, Deng Y, Zheng Z Z, Huang W, Chen L H, Tong Q X, Ming Y L. Corilagin, a promising medicinal herbal agent. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2018, 99: 43-50.
- [40] Xu S K, Zuo A X, Guo Z J, Wan C P. Ethyl caffeate ameliorates collagen-induced arthritis by suppressing Th1 immune response. *Journal of Immunology Research*, 2017, 2017: 7416792.
- [41] Devkota H P, Kurizaki A, Tsushiro K, Adhikari-Devkota A, Hori K, Wada M, Watanabe T. Flavonoids from the leaves and twigs of *Lindera sericea* (Seibold Et Zucc.) Blume var. *sericea* (Lauraceae) from Japan and their bioactivities. *Functional Foods in Health and Disease*, 2021, 11(1): 34.
- [42] Hayder N, Bouhlel I, Skandrani I, Kadri M, Steiman R, Guiraud P, Mariotte A M, Ghedira K, Dijoux-Franca M G, Chekir-Ghedira L. *In vitro* antioxidant and antigenotoxic potentials of myricetin-3-o-galactoside and myricetin-3-o-rhamnoside from *Myrtus communis*: modulation of expression of genes involved in cell defence system using cDNA microarray. *Toxicology in Vitro: an International Journal Published in Association With BIBRA*, 2008, 22(3): 567-581.
- [43] 李俊年, 刘季科. 植物化学防卫与植食性哺乳动物的适应对策. *兽类学报*, 2000, 20(3): 225-232.