

# 繁殖期杂色山雀应激水平的皮质酮浓度 与繁殖投入的关系

王行行 万冬梅 张雷 王娟\*

辽宁大学生命科学院, 辽宁省动物资源与疫病防治重点实验室 沈阳 110036

**摘要:** 皮质酮是鸟类重要的糖皮质激素, 在其适应环境变化及压力应激反应中起重要的调节作用。非应激状态时, 鸟类血浆皮质酮浓度处于基线水平, 当鸟类面对应激刺激时, 血浆皮质酮浓度迅速升高, 应激水平的皮质酮对鸟类个体生存至关重要。然而, 目前繁殖季鸟类血浆应激水平的皮质酮浓度变化及其与繁殖投入关系的研究结果存在种间差异, 仍需在不同的物种中进行实验研究。本研究分析了繁殖季杂色山雀 (*Sittiparus varius*) 血浆应激水平的皮质酮浓度在繁殖阶段的变化, 及育雏期亲鸟血浆应激水平的皮质酮浓度与繁殖参数和亲鸟育雏投入的关系。结果显示, 与求偶期相比, 育雏期杂色山雀亲鸟血浆应激水平的皮质酮浓度极显著升高 ( $P < 0.001$ ), 雌性与雄性亲鸟之间无显著性差异 ( $P > 0.05$ ); 雌性与雄性亲鸟血浆应激水平的皮质酮浓度与繁殖参数、亲鸟递食投入、巢防卫行为均无显著相关性 ( $P > 0.05$ )。

**关键词:** 皮质酮; 亲代投入; 巢防卫; 杂色山雀

**中图分类号:** Q958 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2021) 06-836-08

## The Relationships of Stress-induced Corticosterone and Reproductive Investment in Varied Tits

WANG Xing-Xing WAN Dong-Mei ZHANG Lei WANG Juan\*

Key Laboratory of Animal Resource and Epidemic Disease Prevention, Department of Life Sciences,

Liaoning University, Shenyang 110036, China

**Abstract:** Corticosterone (CORT) is one of the most important glucocorticosteroid in birds. When subjected to human interference, capture, harsh environment and other stress stimulation, the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis is activated and corticosterone would be synthesized in large quantities, which then modifies physiology and behavior. Capture followed by the collection of blood samples over 5 - 30 min is a widely used stressor in studies of stress-induced corticosterone in birds. Stress-induced corticosterone is essential for individual survival. However, current results on the changes of plasma stress-induced

**基金项目** 国家自然科学基金项目 (No. 31872231), 辽宁省博士科研启动基金计划项目 (No. 2019-BS-107);

\* 通讯作者, E-mail: wangjuan@lnu.edu.cn;

**第一作者介绍** 王行行, 女, 硕士研究生; 研究方向: 动物学; E-mail: 2434992014@qq.com。

收稿日期: 2021-04-08, 修回日期: 2021-09-28 DOI: 10.13859/j.cjz.202106005

corticosterone during the breeding seasons and its relationship with reproduction are significantly different, and experimental studies in different species are still needed. In our study, Varied Tits (*Sittiparus varius*) were caught with mist nets in the courtship periods (from March to April in 2019); and about 50  $\mu$ l blood samples were taken by puncturing the brachial vein within 10 - 15 min. Parental birds were captured with nest-box traps when the nestlings were 6 - 8 days old, and blood samples were taken within 10 - 15 min. After centrifugalization, all blood plasma samples were analyzed for stress-induced corticosterone concentration by avian corticosterone ELISA kit. Independent sample t-test was used to compare the stress-induced corticosterone concentration during the courtship periods and nestling feeding periods. Multiple linear regression analysis was used to analyze the relationships between stress-induced corticosterone of parental birds in nestling feeding periods and the reproductive investment of Varied Tits. The results showed that, compared with the courtship periods, the stress-induced corticosterone concentration of Varied Tits increased significantly in nestling feeding periods (female:  $t_{(29, 29)} = -10.782$ ,  $df = 56$ ,  $P < 0.05$ ; male:  $t_{(50, 31)} = -10.207$ ,  $df = 43.099$ ,  $P < 0.05$ ; Fig. 1). And there was no significant difference between male and female parental birds (courtship:  $t_{(29, 50)} = -0.684$ ,  $df = 77$ ,  $P > 0.05$ ; nestling breeding period:  $t_{(29, 31)} = 0.078$ ,  $df = 58$ ,  $P > 0.05$ ; Fig. 1). The concentration of stress-induced corticosterone had no significant effect on reproductive parameters ( $P > 0.05$ ; Fig. 2), feeding investment and nest defense ( $P > 0.05$ ; Fig. 3). Our studies presented differences of plasma stress-induced corticosterone in breeding seasons of Varied Tits, and provided scientific basis for the researches and protection of Varied Tits.

**Key words:** Corticosterone; Reproductive investment; Nest defense; Varied Tit, *Sittiparus varius*

繁殖是鸟类生活史的关键环节, 关乎其种群的生存和发展 (Stahl et al. 2006)。鸟类的繁殖投入是亲代为保证子代存活而进行的一切能量投入行为, 包括产卵、孵卵、育雏和巢防卫等投入, 能量消耗巨大 (Parish et al. 1998)。然而, 个体资源是有限的, 对当前繁殖的高投入会减少未来繁殖成功率或增加个体死亡率 (Daan et al. 1996, Santos et al. 2012)。因此, 理论上动物双亲应具备对自身生存与繁殖投入进行权衡选择的能力, 通过采取不同的繁殖对策, 以获得最大的繁殖适合度 (Skibieli et al. 2013)。

皮质酮是鸟类重要的糖皮质激素 (Nilsson et al. 2009), 非应激状态下, 皮质酮浓度处于基线水平, 当受到人为干扰、捕获、恶劣环境等应激刺激时, 下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴 (hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA 轴) 被激活, 皮质酮激素合成增加 (Harvey et al. 1984, Wingfield et al. 1998, Li et al. 2019), 进

而调节个体行为。当面临突发状况时, 应激水平的皮质酮有助于鸟类减轻或逃离伤害, 对个体生存至关重要 (Sapolsky et al. 2000, Romero et al. 2007, Béziers et al. 2020)。

作为鸟类重要的生活史阶段, 繁殖季节个体在应激状态时的皮质酮浓度会发生改变, 但不同研究结果之间差异显著。如家麻雀 (*Passer domesticus*) 育雏期应激水平的皮质酮浓度显著高于求偶期 (Lattin et al. 2012), 非洲的雄性石鹑 (*Saxicola torquata*) 求偶期应激水平的皮质酮浓度高于育雏期 (Apfelbeck et al. 2017), 而白腰雪雀 (*Onychostruthus taczanowskii*) 求偶期与育雏期应激水平的皮质酮浓度无显著差异 (Li et al. 2020)。此外, 研究也证实, 应激水平的皮质酮浓度与鸟类繁殖投入之间存在一定的关系 (Silverin 1986, Ouyang et al. 2012), 如对雄性家麻雀的研究发现, 应激水平的皮质酮浓度与个体对子代的递食率呈显著负相关关系, 与繁殖巢中雏鸟数量呈显著正相关关系

(Lendvai 2010); 大山雀 (*Parus major*) 应激水平的皮质酮浓度与繁殖巢出雏数呈显著负相关关系 (Ouyang et al. 2013); 而家燕 (*Hirundo rustica erythrogaster*) 应激水平的皮质酮浓度与窝卵数无关 (Vitousek et al. 2014)。尽管各项研究表明, 应激水平的皮质酮浓度在繁殖季会发生明显改变, 并与繁殖投入间存在一定关系, 但不同研究结果之间存在显著性差异。为了更好地理解繁殖季应激水平的皮质酮浓度变化及其与繁殖投入之间的关系, 仍然需要进行不同物种的实验验证。

杂色山雀 (*Sittiparus varius*) 是一种狭域分布、东亚地区特有的小型森林洞巢雀形目鸟类, 属社会性单配制, 晚成鸟, 由雌雄双亲共同育雏。杂色山雀环境适应能力强, 可利用人工巢箱繁殖 (王爽等 2007), 有利于实验的开展及数据收集。在研究地, 杂色山雀繁殖巢蛇捕食率较高, 亲鸟巢防卫行为对提高繁殖成功率具有显著影响 (景春雷 2019)。在本研究中, 以杂色山雀为研究物种, 分析繁殖期杂色山雀血浆中应激水平的皮质酮浓度变化及其与亲鸟繁殖参数、递食量和巢防卫等的关系, 以提供皮质酮与鸟类繁殖投入关系的物种特异性数据。

## 1 实验方法

### 1.1 鸟类血样采集

本实验的研究地点位于辽宁省大连市仙人洞国家级自然保护区内 (122°53'24" ~ 123°03'30" E, 39°54'00" ~ 40°03'00" N, 海拔 200 ~ 600 m)。保护区内悬挂约 400 个人工巢箱 (长 × 宽 × 高为 16 cm × 14 cm × 34 cm), 招引杂色山雀繁殖。

网捕是野生鸟类面临的应激源之一, 前期研究证实, 鸟类被捕获后 3 min 内血浆皮质酮浓度为基线皮质酮浓度, 5 ~ 30 min 内为应激水平的皮质酮浓度 (Romero et al. 2005)。在 2019 年 3 和 4 月, 采用雾网结合鸣声、食物招引的方法捕捉求偶期杂色山雀, 平均于捕捉后约 10 ~ 15 min 内由翅下肱静脉取血 50  $\mu$ l。3

至 7 月间, 每 1 ~ 3 d 巡查招引人工巢箱一次, 收集杂色山雀繁殖参数, 包括首枚卵日期、窝卵数、出雏数和出飞数, 并计算出雏率 (即出雏数与窝卵数之比) 和出飞率 (即出飞数与出雏数之比)。在雏鸟 6 ~ 8 日龄时, 采用巢箱捕鸟器 (Zhang et al. 2019) 捕捉育雏期杂色山雀亲鸟, 佩戴数字脚环和彩环, 用于后期个体识别, 并于捕捉后平均约 10 ~ 15 min 内于翅下肱静脉取血 50  $\mu$ l。取血后立刻把实验对象原地放归。所有采集的血液样本暂时保存于液氮中, 实验室内取出离心后, 用于性别分子鉴定和血浆应激水平的皮质酮浓度测定。

实验共收集 139 份杂色山雀血液样本, 并通过 P2/P8 引物扩增确定成鸟性别。其中, 求偶期 79 份, 包括雌性 29 份, 雄性 50 份; 育雏期 60 份, 包括雌性 29 份, 雄性 31 份。共收集到 58 只杂色山雀繁殖参数数据。

### 1.2 亲鸟递食量测定

前期研究表明, 雏鸟 10 ~ 12 日龄为杂色山雀育雏高峰 (景春雷等 2019)。在雏鸟 11 日龄时, 06:30 时之前在巢箱口架设萤石 S2 运动相机 (CS-S2-68WFBS, 杭州萤石网络技术有限公司) 录制杂色山雀育雏视频, 相机采集数据时间段为 7:00 ~ 10:00 时, 每巢总计采集数据时长为 3 h。实验共收集 16 只杂色山雀递食量和递食率数据, 包括雌性和雄性亲鸟各 8 只。后期利用 PotPlayer 播放器逐帧回放视频, 统计杂色山雀亲鸟递食信息。杂色山雀亲鸟每次喂食的食物体积差异较大, 根据每次喂食的食物相对于亲鸟喙体积的倍数进行赋值 (Wright et al. 2010), 统计杂色山雀亲鸟的递食量: 食物体积小于杂色山雀喙体积, 赋值为 1; 食物体积为杂色山雀喙体积 1 ~ 2 倍, 赋值为 2; 食物体积为杂色山雀喙体积 2 ~ 2.5 倍, 赋值为 3; 食物体积为杂色山雀喙体积 2.5 ~ 3 倍, 赋值为 4; 食物体积大于杂色山雀喙体积 3 倍, 赋值为 5。

亲鸟每小时递食量, 即 7:00 ~ 10:00 时亲鸟递食量赋值的总和除以 3; 亲鸟每小时递食率

为 7:00 ~ 10:00 时亲鸟递食次数的总和除以 3。

### 1.3 巢防卫测定

通过报警鸣声回放实验来检测杂色山雀双亲的巢防卫强度 (Stenhouse et al. 2005)。回放实验选择音质较好的 3 段杂色山雀报警鸣声, 每段报警鸣声时长为 2 min, 每巢都播放 3 段报警鸣声, 回放顺序采取随机播放法, 每巢实验均在 1 d 内完成。实验过程中, 音箱固定于三脚架上, 安放在巢箱前 4 ~ 6 m 处, 安置好音箱 2 min 之后播放报警鸣声, 以降低人为干扰的影响。准备就绪后, 实验人员在 10 m 外隐蔽点保持不动, 用望远镜观察并记录雌雄亲鸟的反应, 单次观察时长 30 min。记录亲鸟彩环颜色, 便于后期区分雌雄。根据雌雄鸟对回放声音的应答反应进行赋值。亲鸟未返回, 赋值为 0; 亲鸟在 5 m 外静止观望, 赋值为 1; 亲鸟在 5 m 外静止观望、警报, 赋值为 2; 亲鸟在 5 m 外跳跃警报, 赋值为 3; 亲鸟在 5 m 内静止观望, 赋值为 4; 亲鸟在 5 m 内静止观望、警报, 赋值为 5; 亲鸟在 5 m 内跳跃警报, 赋值为 6。

实验共收集雌性和雄性亲鸟各 23 只, 总计 46 只杂色山雀巢防卫数据。

### 1.4 皮质酮浓度测定

采用鸟类皮质酮 (corticosterone, CORT) 酶联免疫分析试剂盒 (KT5434-A, 江苏科特生物科技有限公司) 应用双抗体夹心法测定杂色山雀亲鸟血浆应激水平的皮质酮浓度。亲鸟血液样本 3 000 r/min 离心 5 min, 收集上清, 取 10  $\mu$ l 血浆样本, 加入到纯化的鸟类皮质酮抗体包被的微孔板中, 与辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的皮质酮抗体结合, 形成抗体-抗原-酶标抗体复合物, 经过彻底洗涤后加入 3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺 (3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine, TMB) 显色剂, 37  $^{\circ}$ C 反应 10 min 后加入终止液, 此时待测液由蓝色立即转变为黄色。颜色的深浅和样品中的皮质酮浓度成正相关, 用酶标仪 [357-906359, Multiskan FC, 赛默飞世尔 (上海)

仪器有限公司] 在 450 nm 波长下测定吸光度 (A 值), 通过标准曲线计算样品中应激水平的皮质酮浓度。

### 1.5 统计分析

采用 SPSS 20 对数据进行分析, 所有数据的置信区间在 95%。采用独立样本 *T* 检验分析求偶期与育雏期雌雄杂色山雀血浆应激水平的皮质酮浓度差异, 采用多元线性回归分析繁殖巢内雌雄亲鸟血浆应激水平的皮质酮浓度与繁殖参数、递食投入及巢防卫的关系, 即以繁殖巢亲鸟皮质酮浓度和性别作为两个自变量, 分析其与繁殖参数、递食投入及巢防卫的关系。数据以平均值  $\pm$  标准差 (Mean  $\pm$  SD) 表示,  $P < 0.05$  为显著水平。

## 2 结果

### 2.1 杂色山雀应激水平的皮质酮浓度变化

独立样本 *T* 检验显示, 求偶期与育雏期相比, 杂色山雀应激水平的皮质酮浓度具有极显著差异 (雌性:  $t = -10.782$ ,  $df = 56$ ,  $P < 0.001$ ; 雄性:  $t = -10.207$ ,  $df = 43.099$ ,  $P < 0.001$ ; 图 1), 育雏期应激水平的皮质酮浓度显著升高。但上述两时期杂色山雀雌雄亲鸟间应激水平的皮质酮浓度均无显著性差异 (育雏期:  $t = -0.684$ ,  $df = 77$ ,  $P > 0.05$ ; 求偶期:  $t = 0.078$ ,  $df = 58$ ,  $P > 0.05$ ; 图 1)。

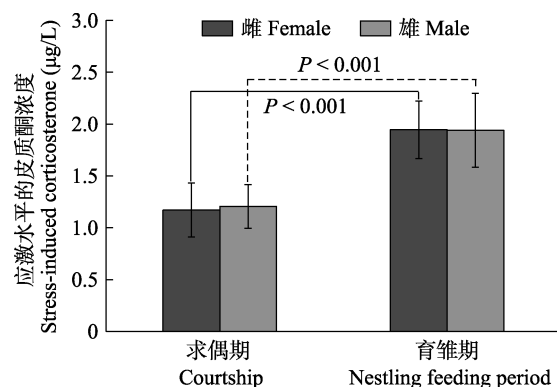


图 1 繁殖季杂色山雀应激水平的皮质酮浓度变化  
Fig. 1 Stress-induced corticosterone concentration of Varied Tit during breeding season

### 2.2 杂色山雀亲鸟育雏期应激水平的皮质酮与繁殖参数的关系

因为求偶期捕捉的杂色山雀多采用自然巢箱繁殖,收集到的繁殖数据较少,因此,本实验选择育雏期皮质酮浓度分析繁殖巢内雌性和雄性亲鸟应激水平的皮质酮浓度与繁殖参数的关系。多元线性回归分析显示,育雏期杂色山雀亲鸟血浆应激水平的皮质酮浓度及

亲鸟性别与繁殖巢窝卵数、出雏数、出雏率、出飞数及出飞率这些繁殖参数均无显著相关(图 2)。

### 2.3 杂色山雀亲鸟育雏期应激水平皮质酮与递食投入的关系

育雏期杂色山雀亲鸟应激水平的皮质酮浓度及亲鸟性别与亲鸟递食投入均无显著相关关系(图 3)。

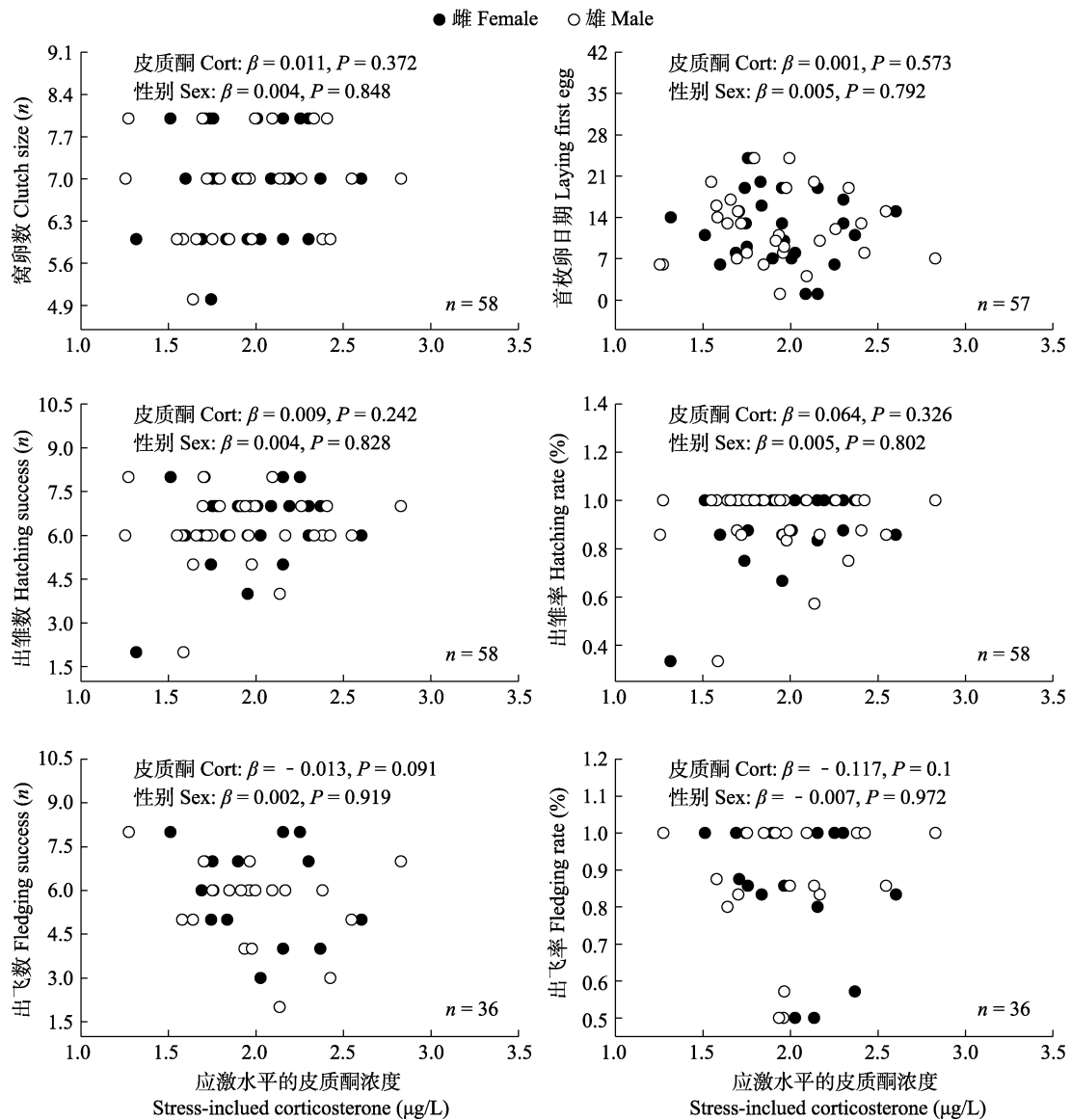


图 2 育雏期杂色山雀亲鸟应激水平皮质酮浓度与繁殖参数的关系

Fig. 2 Relationship between stress-induced corticosterone and breeding parameters during the nestling feeding period of the Varied Tit

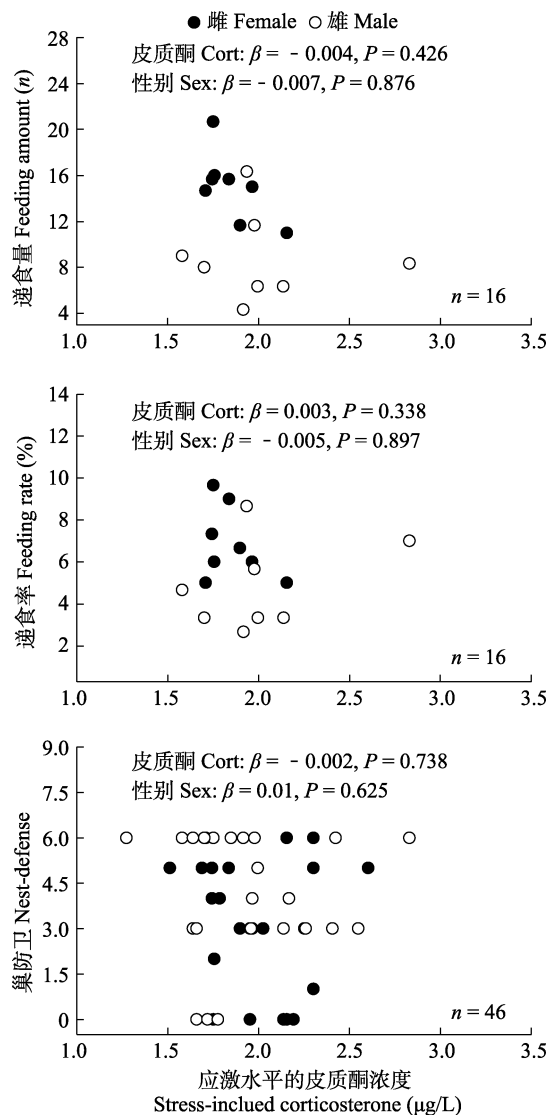


图3 育雏期杂色山雀应激水平皮质酮浓度与递食投入、巢防卫的关系

Fig. 3 Relationship between stress-induced corticosterone and feeding investment and nest-defense during the nestling feeding period of the Varied Tit

### 3 讨论

应激水平的皮质酮是鸟类面临外界刺激时的一种生理反应，是个体应对刺激、维持生存的重要手段 (Sapolsky et al. 2000, Breuner et al. 2008)。本研究发现，与求偶期相比，育雏期杂色山雀血浆应激水平的皮质酮浓度极显著增

加。这一方面可能是由于在繁殖过程中鸟类肾上腺敏感性增加，受到应激时分泌皮质酮的能力增强 (Romero et al. 1998)。杂色山雀育雏期应激水平的皮质酮是在雏鸟 6~8 日龄时获得，面临着羽翼即将成熟的雏鸟，为了保证雏鸟的顺利出飞，下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴变得极为敏感，当面临应激刺激时，应激水平的皮质酮浓度迅速且极显著性升高。另一方面，可能与本研究地点较高的巢捕食压力有关 (李乐等 2011)，捕食者的存在使鸟类应激水平的皮质酮浓度更高 (Canoine et al. 2002)。本研究地中，2019 年鸟类育雏期巢的蛇捕食率高达 69.57%，所以杂色山雀可能因面临较大捕食压力而保持较高的应激水平皮质酮浓度。

应激水平的皮质酮是鸟类个体生存策略的重要体现 (Hau et al. 2010)。当面临外界刺激时，较高的应激水平的皮质酮浓度会抑制鸟类繁殖投入 (Vitousek et al. 2014)，增加个体生存率 (Patterson et al. 2014)，但这种关系在不同鸟类物种间差异显著。在本研究中，野生状态下杂色山雀亲鸟应激水平的皮质酮浓度与窝卵数、出雏数、出雏率、出飞数、出飞率、递食率、递食量、巢防卫等繁殖投入行为均无显著相关关系。本研究结果与对赭红尾鸲 (*Phoenicurus ochruros*) (Villavicencio et al. 2014) 和三趾鸥 (*Rissa tridactyla*) (Chastel et al. 2005) 等的研究一致，即生理状态下血浆应激水平的皮质酮浓度与雌雄亲鸟的繁殖投入无关。我们推测，一方面，杂色山雀是一种社会性单配制晚成鸟，雌雄亲鸟在繁殖过程中的投入是影响繁殖成效的关键。在面临短暂的压力时，为了提高繁殖成功率，会尽可能增加繁殖投入，使得繁殖投入与血浆中应激水平的皮质酮浓度呈现非耦合关系。另一方面，应激状态下，个体应激水平的皮质酮浓度随时间的变化很大，在采集杂色山雀成鸟血样过程中，操作时长存在一定的差异，可能导致实验结果间无显著相关性。后期应进一步补充相关的实验结果。当然，在研究过程中，本研究仅关注了应

激水平的皮质酮浓度，没有关注个体基线皮质酮及应激状态下个体皮质酮浓度的变化情况，这也可能导致本研究结果的相关性不显著。此外，结合前期研究，我们推测，对于杂色山雀双亲，其繁殖投入可能更多受到个体体重、鸣声等的影响，如在景春雷等（2019）的研究中，雌性亲鸟递食率与自身喙宽呈极显著正相关。总的来说，我们的研究表明，杂色山雀血浆应激水平皮质酮浓度在繁殖阶段会发生改变，亲鸟血浆应激水平皮质酮浓度与窝卵数等繁殖参数及递食投入、巢防卫等行为无显著相关性。

**致谢** 感谢辽宁仙人洞国家级自然保护区管理局工作人员对本研究野外工作的大力支持。

## 参 考 文 献

- Apfelbeck B, Helm B, Illera J C, et al. 2017. Baseline and stress-induced levels of corticosterone in male and female Afrotropical and European temperate stonechats during breeding. *BMC Evolutionary Biology*, 17(1): 1–16.
- Béziers P, Korner-Nievergelt F, Jenni L, et al. 2020. Glucocorticoid levels are linked to lifetime reproductive success and survival of adult barn owls. *Journal of Evolutionary Biology*, 33(12): 1689–1703.
- Breuner C W, Patterson S H, Hahn T P. 2008. In search of relationships between the acute adrenocortical response and fitness. *General and Comparative Endocrinology*, 157(3): 288–295.
- Canoine V, Hayden T J, Rowe K, et al. 2002. The stress response of European stonechats depends on the type of stressor. *Behaviour*, 139(10): 1303–1311.
- Chastel O, Lacroix A, Weimerskirch H, et al. 2005. Modulation of prolactin but not corticosterone responses to stress in relation to parental effort in a long-lived bird. *Hormones and Behavior*, 47(4): 459–466.
- Daan S, Deerenberg C, Dijkstra C. 1996. Increased daily work precipitates natural death in the kestrel. *Journal of Animal Ecology*, 65(5): 539–544.
- Harvey S, Phillips J G, Rees A, et al. 1984. Stress and adrenal function. *Journal of Experimental Zoology*, 232(3): 633–645.
- Hau M, Ricklefs R E, Wikelski M, et al. 2010. Corticosterone, testosterone and life-history strategies of birds. *Proceedings Biological Sciences*, 277(1697): 3203–3212.
- Lattin C R, Bauer C M, Bruijn R D, et al. 2012. Hypothalamus–pituitary–adrenal axis activity and the subsequent response to chronic stress differ depending upon life history stage. *General and Comparative Endocrinology*, 178(3): 494–501.
- Lendvai Á Z, Chastel O. 2010. Natural variation in stress response is related to post-stress parental effort in male house sparrows. *Hormones and Behavior*, 58(5): 936–942.
- Li D, Davis J E, Wang G, et al. 2020. Coping with extremes: Remarkably blunt adrenocortical responses to acute stress in two sympatric snow finches on the Qinghai-Tibet Plateau during winter relative to other seasons. *General and Comparative Endocrinology*, 291: 113434.
- Li M, Zhu W, Wang Y, et al. 2019. Effects of capture and captivity on plasma corticosterone and metabolite levels in breeding Eurasian Tree Sparrows. *Avian Research*, 10(2): 16
- Nilsson A L K, Sandell M I. 2009. Stress hormone dynamics: An adaptation to migration? *Biology Letters*, 5(4): 480–483.
- Ouyang J Q, Quetting M, Hau M. 2012. Corticosterone and brood abandonment in a passerine bird. *Animal Behaviour*, 84(1): 261–268.
- Ouyang J Q, Sharp P, Quetting M, et al. 2013. Endocrine phenotype, reproductive success and survival in the great tit, *Parus major*. *Journal of Evolutionary Biology*, 26(9): 1988–1998.
- Parish D M B, Coulson J C. 1998. Parental investment, reproductive success and polygyny in the lapwing, *Vanellus vanellus*. *Animal Behaviour*, 56(5): 1161–1167.
- Patterson S H, Hahn T P, Cornelius J M, et al. 2014. Natural selection and glucocorticoid physiology. *Journal of Evolutionary Biology*, 27(2): 259–274.
- Romero L M, Butler L K. 2007. Endocrinology of stress. *International Journal of Comparative Psychology*, 20(2): 89–95.
- Romero L M, Reed J M. 2005. Collecting baseline corticosterone samples in the field: Is under 3 min good enough?. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 140(1): 73–79.

- Romero L M, Wingfield J C. 1998. Seasonal changes in adrenal sensitivity alter corticosterone levels in Gambel's White-Crowned Sparrows (*Zonotrichia leucophrys gambelii*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 119(1): 31–36.
- Santos E S A, Nakagawa S. 2012. The costs of parental care: A meta-analysis of the trade-off between parental effort and survival in birds. *Journal of Evolutionary Biology*, 25(9): 1911–1917.
- Sapolsky R M, Romero L M, Munck A U. 2000. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocrine Reviews*, 21(1): 55–89.
- Silverin B. 1986. Corticosterone-binding proteins and behavioral effects of high plasma levels of corticosterone during the breeding period in the pied flycatcher. *General and Comparative Endocrinology*, 64(1): 67–74.
- Skibił A L, Speakman J R, Hood W R. 2013. Testing the predictions of energy allocation decisions in the evolution of life-history trade-offs. *Functional Ecology*, 27(6): 1382–1391.
- Stahl J T, Oli M K. 2006. Relative importance of avian life-history variables to population growth rate. *Ecological Modelling*, 198(1/2): 23–39.
- Stenhouse I J, Gilchrist H G, Montevecchi W A. 2005. An experimental study examining the anti-predator behaviour of Sabine's gulls (*Xema sabini*) during breeding. *Journal of Ethology*, 23(2): 103–108.
- Villavicencio C P, Apfelbeck B, Goymann W. 2014. Parental care, loss of paternity and circulating levels of testosterone and corticosterone in a socially monogamous song bird. *Frontiers in Zoology*, 11(1): 11.
- Vitousek M N, Jenkins B R, Safran R J. 2014. Stress and success: Individual differences in the glucocorticoid stress response predict behavior and reproductive success under high predation risk. *Hormones and Behavior*, 66(5): 812–819.
- Wingfield J C, Maney D L, Breuner C W, et al. 1998. Ecological bases of hormone-behavior interactions: the "Emergency Life History Stage". *American Zoologist*, 38(1): 191–206.
- Wright J, McDonald P G, Marvelde L, et al. 2010. Helping effort increases with relatedness in bell miners, but "unrelated" helpers of both sexes still provide substantial care. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 277(1680): 437–445.
- Zhang L, Wang J, Zhang C, et al. 2019. An improved automatic trap for capturing birds in nest boxes. *Ethology Ecology and Evolution*, 31(3): 277–282.
- 景春雷. 2019. 杂色山雀育雏与巢防卫投入特征及影响因素研究. 沈阳: 辽宁大学硕士学位论文.
- 景春雷, 李可可, 何亚奇, 等. 2019. 杂色山雀双亲差异性育雏策略. *生态学报*, 39(15): 5725–5729.
- 李乐, 万冬梅, 刘鹤, 等. 2011. 人工巢箱条件下杂色山雀的巢位选择及其对繁殖成功率的影响. *生态学报*, 31(24): 7492–7499.
- 王爽, 金春日, 万冬梅, 等. 2007. 人工巢箱招引杂色山雀研究. *辽宁林业科技*, (2): 8–11.