

丹顶鹤弃卵和正常卵卵壳超微结构及 化学元素含量的比较分析

杨志宏^① 刘志超^① 高忠燕^② 张显光^② 冯文^① 曹业萍^①

① 齐齐哈尔大学生命科学与农林学院 齐齐哈尔 161006; ② 黑龙江扎龙国家级自然保护区 齐齐哈尔 161003

摘要: 为研究繁殖丹顶鹤 (*Grus japonensis*) 弃卵原因, 对其弃卵与正常卵壳超微结构及化学元素含量进行比较。以 2014 至 2020 年在扎龙保护区收集到丹顶鹤弃卵和正常孵化的卵各 6 枚为研究对象, 利用电子扫描电镜观察比较其超微结构, 采用电感耦合等离子体光谱仪测量其化学元素含量, 并对其卵壳厚度和密度进行测量和比较。弃卵壳厚度、密度分别为正常卵壳厚度、密度的 68.0% ($P < 0.01$) 和 71.5% ($P < 0.01$); 弃卵卵壳表面晶体层厚度不均, 与栅栏层之间界限不明显, 外表皮层有龟裂和条形两种裂纹, 栅栏锥体层晶体中有微小球状中空结构和类似溶洞的腔室结构, 壳膜层纤维表面的片状突起较少, 这些结构均与正常卵壳不同。检测卵壳 23 种化学元素中, 弃卵卵壳 Ca、Na、P、Mg 和 K 元素含量显著低于正常卵壳 ($P < 0.05$)。从卵壳结构和元素分析, 卵壳元素含量异常、结构和功能缺陷有可能是导致其亲鸟弃卵的原因之一, 这与亲鸟占据生境资源情况、与其他鸟类间繁殖压力、食物可获得性和生存对策等交互作用的影响有关。

关键词: 丹顶鹤; 卵壳; 超微结构; 元素含量

中图分类号: Q954 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263 (2023) 01-077-07

Comparison of Ultrastructure and Element Content between Abandoned and Normal Eggshells of *Grus japonensis*

YANG Zhi-Hong^① LIU Zhi-Chao^① GAO Zhong-Yan^② ZHANG Xian-Guang^②
FENG Wen^① Cao Ye-Ping^①

① College of Life Science, Agriculture and Forestry, Qiqihaer University, Qiqihaer 161006;

② Zhalong National Nature Reserve, Qiqihaer 161003, China

Abstract: [Objectives] Abandoning eggs after nesting was a rare biological phenomenon for breeding Red-crowned Cranes (*Grus japonensis*), but it does occur occasionally. So far, it was unknown whether the parents of Red-crowned Cranes abandon eggs due to internal or external disturbances. Egg was the reproductive unit and the starting point of growth and development of birds. The important role of eggshells should be to bear the weight of hatching parents, to exchange gas with the outside world, to prevent excessive

基金项目 黑龙江省自然科学基金项目 (No. C2016059), 齐齐哈尔市科技局项目 (No. RKX-201605);

第一作者简介 杨志宏, 男, 副教授; 研究方向: 鸟类保护生物学; E-mail: yzh0452@163.com。

收稿日期: 2022-04-01, 修回日期: 2022-08-23 DOI: 10.13859/j.cjz.202301007

loss of water in eggs, to protect embryonic development, and to form organs and tissues such as bones. By comparing the differences of ultrastructure and element content between abandoned and normal eggshells, we explored the reasons why *G. japonensis* abandon eggs, and hoped to provide a reference for the protection of Red-crowned Crane and the formulation of corresponding protection strategies. **[Methods]** From 2014 to 2020, 6 abandoned eggs and 6 normal hatching eggs of breeding *G. japonensis* were collected in Zhalong National Nature Reserve, Heilongjiang Province. We studied the eggshells ultrastructure, element content, the thickness and density. The ultrastructural differences were compared by scanning electron microscopy (Hitachi X-650, Japan), the element content was measured by inductively couple plasma spectrometry (Agilent 7500, USA), the thickness was measured by electronic micrometer (Mitutoyo 422-230/0 - 25 mm, Japan, ± 0.003 mm), the mass of eggshell samples was weighed by electronic balance (Sartorius BSA124S, Germany, ± 0.1 g), and the density was measured by drainage method. The data were analyzed using SPSS (16.0 version). The thickness, density and element content of eggshells between abandoned and normal eggs were compared by *t*-test (Independent-samples). The thickness of surface layer of crystal, palisade layer, cone layer and shell membrane in the ultrastructure of the eggshell were compared between two groups respectively. All results were expressed as Mean \pm SD, and $P < 0.05$ was taken to be statistically significant. **[Results]** The thickness and density of abandoned eggshell were 68.0% ($P < 0.01$) and 71.5% ($P < 0.01$) of normal eggshell respectively (Table 1). The thickness of the surface layer of crystal, palisade cone layer and eggshell membrane accounted for 5.5%, 86.9% and 7.6% in the normal eggshell, and the thickness of the surface layer of crystal, palisade cone layer and eggshell membrane accounted for 3.9%, 85.9% and 10.2% in the discarded eggshell respectively (Table 2). The ultrastructure of abandoned eggshell was different from normal eggshell, including uneven thickness of the surface crystal layer, no obvious boundary between the surface crystal layer and the palisade layer, cracks and strip cracks in the outer layer, tiny spherical hollow structures and cavity structures similar to karst cave in the cone layer of the fence, and fewer sheet-like protrusions on the surface of shell membrane fiber in the abandoned eggshell (Fig. 1). Among the 23 elements were measured, the contents of Ca, Na, P, Mg and K in abandoned eggshells were significantly lower than in normal eggshells ($P < 0.05$), and there were no significant differences in the contents of Fe, Zn, Cu, Sr, Ag, Ni, Ba, Cr, Mn, Bi, As, B, Ga, Mo, V, Co, Ti and Sc ($P > 0.05$) (Table 3). **[Conclusion]** From the analysis of eggshell structure and elements, the abnormal contents of eggshell elements, structural and functional defects may be one of the reasons for egg abandonment by their parents, which may be related to the interactions of habitat resources occupied by themselves, reproductive pressure with other birds, food availability and survival strategies.

Key words: *Grus japonensis*; Eggshell; Ultrastructure; Element content

卵是鸟类的生殖单元和生长发育的起点。鸟卵的形态、结构和组成成分一直是鸟类学家们感兴趣的研究内容 (Becking 1975, Cusack et al. 2003)。鸟卵壳 (eggshell) 结构具有一定的种属特异性, 可以作为鸟类系统分类与演化研究的依据 (朱曦等 2000, 常崇艳等 2006, 孙嘉晨等 2014), 同时卵壳成分也可作为监测

与评价其栖息生境质量的一个客观指标 (Tilgar et al. 2002, Luo et al. 2013, 2014)。鸟卵壳中某些必需元素含量与鸟类胚胎发育密切相关, 并在一定程度上能够反映亲鸟的营养健康状况 (Larison et al. 2001, 杨志宏等 2020)。正常孵化的卵, 其卵壳应该具有承担孵卵亲鸟体重、屏障保护、与外界进行气体交换、防止卵内水

分过度散失、提供胚胎发育以及骨骼等器官组织形成所需元素等作用。

丹顶鹤 (*Grus japonensis*) 为鹤形目 (Gruiformes) 鹤科 (Gruidae) 的大型杂食性涉禽, 生态学意义上的 K-选择物种, 即低繁殖率 (1 对繁殖鹤每年产 2 枚卵) 和高成活率。IUCN (2012) 和《中国生物多样性红色名录-脊椎动物卷》将其列为濒危级 (endangered, EN) 物种 (蒋志刚等 2016)。自 1976 年以来, 我国就已经开始了针对丹顶鹤的重点保护工作, 成效显著, 截至 2019 年, 有丹顶鹤分布记录的自然保护区达 119 个, 分布在 16 个省区 (林远锋等 2021)。保护区网络的建立为我国丹顶鹤种群复壮发挥了重要作用 (张婷婷等 2019)。

繁殖季节, 保护区内繁殖丹顶鹤筑巢产卵后弃卵这一生物学现象并不常见, 却也偶有发生。至今, 丹顶鹤亲鸟弃卵是由于内因还是外界干扰因素所致还未有研究。通过对丹顶鹤弃卵卵壳与正常孵卵卵壳超微结构及化学元素含量的比较, 来探求丹顶鹤亲鸟弃卵原因, 希望能够为丹顶鹤的就地保护和拟定相应的保护对策提供参考依据。

1 材料处理与研究方法

丹顶鹤卵壳样品采自扎龙国家级自然保护区 (46°52' ~ 47°32' N, 123°47' ~ 123°37' E)。保护区管理局提供正常孵卵的野生鹤卵壳样品 6 枚, 2020 年 4 月采自齐齐哈尔地区。当时已有部分野生繁殖丹顶鹤处于产卵或孵卵早期, 突降大雪和低温导致其孵卵终止, 巡护人员将卵取回, 经确认已无法继续孵化。此外, 经保护区管理局同意, 巡护工作人员提供 2014 年和 2018 年自然生境捡拾弃卵 4 枚, 2 枚/巢, 均为简易巢, 亲鸟弃巢状态且卵已破损, 2016 年 3 月自然生境捡拾弃卵 2 枚 (杨志宏等 2020)。分别将不同时期收集卵壳样品, 风干处理后, 放入封口袋中, 编号和标记, 常温保存。采用电子千分尺 (Mitutoyo 422-230/0 ~ 25 mm, 日本, 精度 ± 0.003 mm) 对卵壳厚度进行测量。

利用电子天平 (Sartorius BSA124S, 德国, 精度 ± 0.1 g) 称量卵壳样品质量。排水法求得卵壳样品的体积 (cm^3)。根据公式 $\rho = m/v$ 计算卵壳密度, ρ 为密度 (单位 g/cm^3), m 为卵壳样品质量 (单位 g), v 为卵壳样品体积 (单位 cm^3)。卵壳超微结构观察与化学元素含量检测在齐齐哈尔大学分析检测中心进行。

超微结构观察前, 相同部位取下卵壳样品, 放入双蒸水内, 浸泡清洗, 然后烘干。经日本 EIKO-3 喷镀仪喷金, 喷金条件为 3 mA 3 min。然后使用日立 X-650 扫描电镜观察。

分别称取适量样品卵壳于硝化罐中, 加入 1 ml HNO_3 (35%), 置于烘箱内, 150 °C, 硝化 4 h。然后用双蒸水定容至 10 ml 待测。采用电感耦合等离子体光谱仪 (Agilent 7500, 美国) 测定卵壳的化学成分。工作参数: 等离子体发生器功率 1.0 kW, 冷却气流量 12 L/min, 溶液提升速率 1.5 ml/min, 雾室压力 298 kPa, 观测高度 14 mm (线圈上方)。

利用 SPSS16.0 软件包进行统计分析。卵壳厚度和密度及元素含量组间比较采用独立样本 t -检验分析。数据均以平均值 \pm 标准差 (Mean \pm SD) 表示, $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。

2 结果

2.1 卵壳结构的扫描电镜观察

正常卵壳由外向内依次分为表面晶体层 (surface layer of crystals)、栅栏层 (palisade layer)、锥体层 (cone layer) 和壳膜层 (eggshell membrane), 弃卵卵壳与正常卵壳超微结构差异极为明显 (图 1a ~ d)。正常卵壳表面晶体层厚度较均匀, 由外向内依次为一薄层致密无缝隙结构 (图 1e) 的外表皮层、结构紧凑晶状结构的晶体表层和球状晶粒结构的球状晶粒内表层, 球状晶粒内表层与栅栏层接壤且界限明显; 弃卵卵壳表面晶体层厚度不均, 外表皮层有不规则龟裂 (赤道区域, 图 1f) 和条形 (钝端, 图 1g) 两种深浅不一的裂纹, 表面晶体层

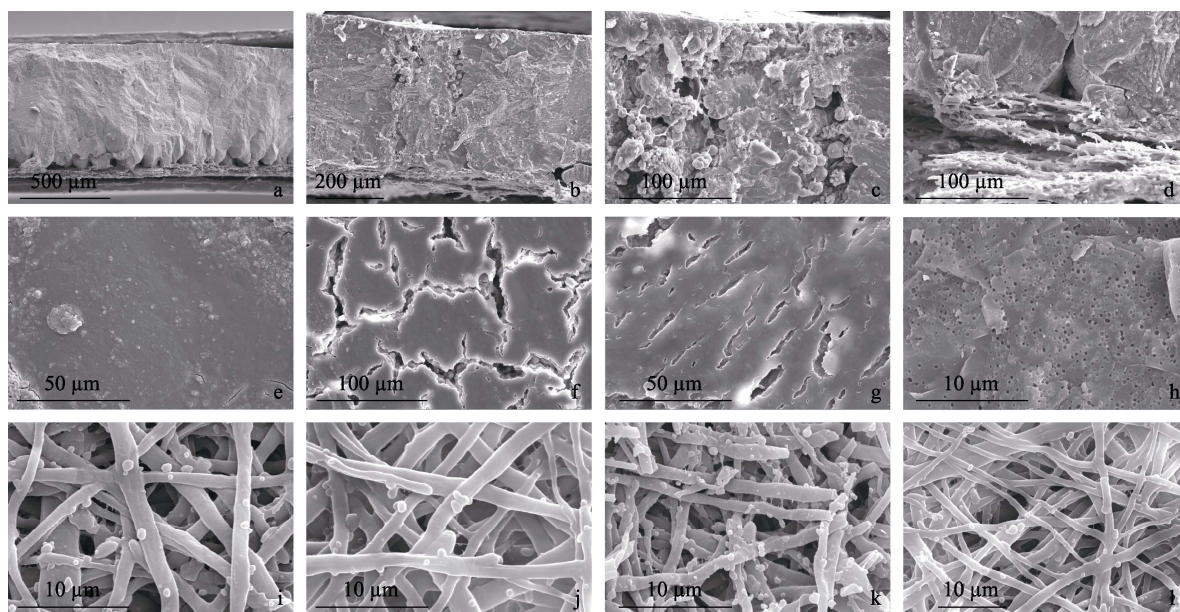


图 1 丹顶鹤正常卵与弃卵卵壳超微结构

Fig. 1 The ultrastructure in normal and abandoned eggshells of Red-crowned Crane

a. 正常卵壳截面, × 80; b. 弃卵卵壳截面, × 150; c. 弃卵卵壳截面上部分, × 500; d. 弃卵卵壳截面下部分, × 500; e. 正常卵壳外表皮层, × 1 000; f. 弃卵卵壳外表皮层, × 500; g. 弃卵卵壳外表皮层, × 1 000; h. 弃卵卵壳栅栏层横切面, × 5 000; i. 正常卵壳膜外层, × 5 000; j. 弃卵壳膜外层, × 5 000; k. 正常卵壳膜内层, × 5 000; l. 弃卵壳膜内层, × 3 000.

a. The section of normal eggshell, × 80; b. The section of abandoned eggshell, × 150; c. The upper part of the section of abandoned eggshell, × 500; d. The lower part of the section of abandoned eggshell, × 500; e. The outer layer of normal eggshell, × 1 000; f. The outer layer of abandoned eggshell, × 500; g. The outer layer of abandoned eggshell, × 1 000; h. The cross section of palisade layer of abandoned eggshell, × 5 000; i. The outer of the normal eggshell membrane layer, × 5 000; j. The outer of the abandoned eggshell membrane layer, × 5 000; k. The inner of the normal eggshell membrane layer, × 5 000; l. The inner of the abandoned eggshell membrane layer, × 3 000.

与栅栏层界限不明显。正常卵壳栅栏锥体层(栅栏层和锥体层无明显分界)晶体结构紧实, 内有许多蜂窝孔洞(vesicular hole); 弃卵卵壳栅栏锥体层晶体中有微小球状中空(hollow ball)(图 1h)和类似溶洞的腔室结构(图 1b, c)。壳膜层(内和外)网络纤维结构表面有数量不等的片状突起(bud-wafer layer structure), 片状突起弃卵少于正常卵(图 1i~l)。

2.2 卵壳厚度和密度

测定卵壳厚度时, 在每枚卵壳赤道端两侧各取测量样品一块。丹顶鹤弃卵卵壳厚度(0.46~0.56 mm, $n = 12$)仅为正常卵壳厚度(0.68~0.82 mm, $n = 12$)的 68.0%, 弃卵卵壳密度仅为正常卵壳密度的 71.5%, 二者差异均为极显

著(表 1)。卵壳中, 正常卵表面晶体层、栅栏锥体层和壳膜层分别占其卵壳厚度的 5.5%、86.9%和 7.6%, 弃卵表面晶体层、栅栏锥体层和壳膜层分别占其卵壳厚度的 3.9%、85.9%和 10.2%(表 2)。

2.3 卵壳元素成分

已测卵壳的 23 种化学元素中, Ca、Na、P、Fe 含量较高, 其质量分数 ω (指样品中所含元素质量与样品质量的比值)均超过 1 mg/g; Sr、Mg 和 Ag 含量次之, 质量分数为 0.1~1 mg/g; K、Zn、Ni、Ba、Cr、Mn、Bi、As、B、Ga、Mo、V、Co、Ti、Sc 元素含量较低, 质量分数为 1~100 $\mu\text{g/g}$; Cu 含量最低, 质量分数低于 1 $\mu\text{g/g}$ (表 3)。弃卵卵壳中 Ca、Na、P、Mg

表 1 正常卵和弃卵卵壳物理参数比较

Table 1 Comparison of physical parameters between normal and abandoned eggshells of *Grus japonensis*

	正常卵 Normal (6 枚)	弃卵 Abandoned (6 枚)	显著性 Significance
样本数 Samples size	12	12	
卵壳厚度 Eggshell thickness (mm)	0.75 ± 0.18	0.51 ± 0.10	$t = 68.863, df = 22, P < 0.01$
卵壳密度 Eggshell density (g/cm ³)	1.86 ± 0.12	1.33 ± 0.10	$t = 23.564, df = 22, P < 0.01$

表 2 正常卵和弃卵卵壳各层厚度比较

Table 2 Comparison of thickness between normal and abandoned eggshells of *Grus japonensis*

	表面晶体层 Surface crystals layer		栅栏锥体层 Palisade and cone layer		壳膜层 Eggshell membrane	
	厚度 Thickness (μm)	占卵壳厚度比 The proportion to thickness of eggshell (%)	厚度 Thickness (μm)	占卵壳厚度比 The proportion to thickness of eggshell (%)	厚度 Thickness (μm)	占卵壳厚度比 The proportion to thickness of eggshell (%)
正常卵 Normal	41.5 (32.9 ~ 50.9)	5.5	651.4 (643.5 ~ 658.4)	86.9	57.1 (49.3 ~ 64.2)	7.6
弃卵 Abandoned	19.9 (10.6 ~ 25.2)	3.9	438.2 (421.6 ~ 447.0)	85.9	51.9 (41.6 ~ 57.9)	10.2

表 3 卵壳化学元素成分及其质量分数比较 (μg/g)

Table 3 Comparison of elements between normal and abandoned eggshells of *Grus japonensis*

化学元素 Chemical element	正常卵 Normal	弃卵 Abandoned	化学元素 Chemical element	正常卵 Normal	弃卵 Abandoned
P	3 120.58	2 620.66	Mn	14.66	12.45
Na	6 860.55	5 656.32	Co	3.38	3.12
Ca	33 498.58	26 362.80	Ni	49.51	47.64
Fe	1 656.32	1 588.66	Zn	68.84	65.89
Mg	362.43	268.82	Ga	6.56	6.19
Sr	696.96	678.44	As	8.88	9.07
Ag	171.48	169.86	Ba	29.36	28.42
K	108.65	88.68	Bi	13.13	12.39
B	8.80	8.96	Mo	4.20	4.37
Ti	1.14	1.26	Sc	1.09	1.23
V	3.99	4.78	Cu	0.86	0.98
Cr	25.88	27.54			

和 K 元素含量仅为正常卵壳的 78.7%、82.4%、83.9%、74.2% 和 81.6%，显著少于正常卵壳 ($P < 0.05$)，其他元素含量差异不显著 ($P > 0.05$)。

3 讨论

鸟卵壳的重要作用在于承担孵卵亲鸟体重、与外界进行气体交换、屏障保护、防止卵内水分过度散失、提供胚胎发育和骨骼等器官组织形成所需元素等。本研究结果发现，丹顶鹤弃卵卵壳中 Ca、Na、P、Mg 和 K 元素含量

显著低于正常孵卵卵壳。这 5 种化学元素含量不足可能会对卵壳的功能和作用产生重要影响。首先，存在无法承担孵卵亲鸟体重的可能性。卵壳厚度应该是种的特性之一，卵壳具有相应的厚度与硬度才能够承担孵卵亲鸟体重和保护内容物。丹顶鹤亲鸟体重较大 (10 kg 左右)，厚且坚固的卵壳应该是承担其雌雄亲鸟轮流孵卵的生理基础。然而，卵壳中含量较高的 Ca、Na 和 P 元素显著减少，其坚固程度也应该随之降低。结果显示，弃卵卵壳的厚度和密

度均显著低于正常孵卵卵壳。因此，与正常孵卵卵壳比较，弃卵卵壳极有可能无法承担孵卵亲鸟的体重。其次，弃卵卵壳可能存在气体交换和保水屏障等功能性缺陷。超微结构比较发现，弃卵卵壳与正常孵卵卵壳之间包括表面晶体层、栅栏层、锥体层和壳膜层都存在较为明显的结构性差异。相比孵卵卵壳，弃卵卵壳的超微结构使其卵壳功能上呈现出与外界进行气体交换能力增强和保水屏障功能减弱的趋势。再次，卵壳中化学元素含量与卵壳内幼鸟胚胎发育时期骨骼等器官组织的形成有关。已知 Ca、P、Na、Mg、K 等化学元素是构成哺乳动物骨骼的重要组分。弃卵卵壳中上述 5 种元素含量不足将会对卵壳内胚胎发育和骨骼等器官组织的形成产生重要影响，甚至有可能导致胚胎发育失败。最后，也不能排除亲鸟弃卵是由于其卵未受精或者是受到外界因素干扰所致。综上所述，本文认为卵壳化学元素含量异常、结构和功能缺陷有可能是导致丹顶鹤亲鸟弃卵的原因之一。

繁殖季节，每一对繁殖鸟类都将占有各自不同的生境资源进行繁殖。占据有利的生境资源，获取足够的能量和营养应该是鸟类成功繁殖的基础和保障。丹顶鹤弃卵卵壳中 Ca、Na、P、Mg 和 K 元素含量显著少于正常孵卵卵壳，这间接反映出雌性亲鸟在产卵前期取食食物中这些元素的含量应该较少。已有繁殖期农田微生物中繁殖丹顶鹤取食玉米对其能量摄入及卵壳特征影响的相关报道（杨志宏等 2020）。已有研究认为，繁殖丹顶鹤能否生产合格的受精卵可能与其产卵前栖息微生境中的食物可获得性及其采取的觅食对策有关。

不同的丹顶鹤繁殖鹤对开始启动繁殖的时间不同。丹顶鹤亲鸟开始启动繁殖前的一段时间内，通常会在比较固定的区域内活动，直至占据微生境资源和筑巢繁殖，较少离开该区域（即其活动区）。此期间，亲鸟的适合度（fitness）将会受到两方面的影响。一方面，亲鸟将会受到所处活动区的地理位置、面积大

小、食物丰富度和食物可获得性等微生境因素的影响；另一方面，亲鸟也需要应对其他大型鸟类甚至小型鸟类占有繁殖资源的竞争压力。例如，保护区内观察发现，2 对繁殖的红嘴鸥（*Larus ridibundus*）（种内互助），采用交替掠飞袭扰方式（激怒反应），仅约 30 min 即可将一对繁殖丹顶鹤驱离其活动区。因此，早启动繁殖的亲鸟将会比晚启动繁殖的亲鸟获得相对更多的繁殖收益。

丹顶鹤亲鸟滞留在活动区后，活动区内可获得食物资源种类和数量将会对其生存和繁殖产生影响。食物可获得性不仅与环境变化密切相关，也会对鸟类的行为、觅食对策、能量收支收益、生存或繁殖等产生重要影响（Zheng et al. 2014, Wang et al. 2016, 罗金明等 2017）。分析动物的食物可获得性时不能脱离其特定的生态位，既要考虑食物的质量、数量、营养和适口性等方面，还要考虑到食物的可摄食时间、动物处理食物的能力及其摄入能量需求等方面（杨志宏等 2015）。鸟类能够充分利用自身特有的物种进化优势和选择最适的能量收支对策来适应生境变化（Guillemette et al. 2012, Hegemann et al. 2012, 吴庆明等 2017）。从能量学角度，丹顶鹤为湿地顶级物种，杂食性鸟类，主要取食鱼类和植物种子，也取食如青蛙、老鼠、土壤动物以及植物根茎等其他食物，具有较高的适合度，在微生境中获取食物和满足生存需求应该不难。然而，生存需求与繁殖需求不同。从营养学角度，不同微生境中食物可获得性差异，很有可能对其繁殖前期的摄入营养需求产生较大影响（杨志宏等 2020）。雌性亲鸟产卵前这段时间内能否获取足够丰富的营养，生产符合孵化标准的受精卵，将取决于所处微生境资源情况、其他繁殖鸟类资源竞争压力和所采取的觅食对策等交互作用和影响。

春迁期，丹顶鹤往往是最早到达繁殖地的大型迁徙鸟类之一。据保护区的资料记载，一直以来，最早到达繁殖地和较早启动繁殖的丹顶鹤亲鸟能够应对冬春交替时期多变的气候变

化, 它们可以在湿地内已经融化的水域觅食活鱼以及漂浮在水面上尚未腐败的鱼类, 也可以在保护区设置的投食点取食(当地产冻储鲫鱼和干玉米粒等), 并可在冰雪尚未完全消融时期就开始交尾、筑巢、产卵和孵化, 即能够正常繁殖。但是, 当遇到极端天气, 如 2020 年 4 月 22 日齐齐哈尔地区突降特大暴雪, 则会对其繁殖产生极大的影响。因此, 建议保护区能在极端天气来临前尽早评估, 必要时开展人为干预, 扩大野外救护效果。

总之, 本文认为卵壳元素含量异常、结构和功能缺陷有可能是导致丹顶鹤亲鸟弃卵的原因之一, 亲鸟弃卵可能与其产卵前期占据的生境资源情况、与其他鸟类间繁殖压力、食物可获得性及其繁殖对策等交互作用的影响有关。

致谢 感谢扎龙国家级自然保护区管理局的大力支持。

参 考 文 献

- Becking J H. 1975. The ultrastructure of the avian eggshell. *Ibis*, 117(2): 143–151.
- Cusack M, Fraser A C, Stachel T. 2003. Magnesium and phosphorus distribution in the avian eggshell. *Comparative Biochemistry and Physiology B: Biochemistry & Molecular Biology*, 134(1): 63–69.
- Guillemette M, Butler P J. 2012. Seasonal variation in energy expenditure is not related to activity level or water temperature in a large diving bird. *The Journal Experimental Biology*, 215(18): 3161–3168.
- Hegemann A, Matson K D, Versteegh M A, et al. 2012. Wild skylarks seasonally modulate energy budgets but maintain energetically costly inflammatory immune responses throughout the annual cycle. *PLoS ONE*, 7(5): e36358.
- Larison J R, Crock J G, Snow C M. 2001. Timing of mineral sequestration in leg bones of White-tailed Ptarmigan. *Auk*, 118(4): 1057–1062.
- Luo J M, Yin X R, Ya Y J, et al. 2013. Pb and Cd bioaccumulations in the habitat and preys of Red-crowned Cranes (*Grus japonensis*) in Zhalong Wetland, Northeastern China. *Biological Trace Element Research*, 156(1): 134–143.
- Luo J M, Ye Y J, Gao Z Y, et al. 2014. Characterization of heavy metal contamination in the habitat of Red-crowned Crane (*Grus japonensis*) in Zhalong Wetland, Northeastern China. *Bulletin of Environmental Contamination Toxicology*, 93(3): 327–333.
- Tilgar V, Mand R, Magi M. 2002. Calcium shortage as a constraint on reproduction in Great Tits *Parus major*: a field experiment. *Journal of Avian Biology*, 33(4): 407–413.
- Wang J Q, Wang J J, Wu X J, et al. 2016. Short photoperiod increases energy intake, metabolic thermogenesis and organ mass in Silky Starlings *Sturnus sericeus*. *Zoological Research*, 37(2): 75–83.
- Zheng W H, Liu J S, Swanson D L. 2014. Seasonal phenotypic flexibility of body mass, organ masses, and tissue oxidative capacity and their relationship to resting metabolic rate in Chinese Bulbuls. *Physiological and Biochemical Zoology*, 87(3): 432–444.
- 常崇艳, 张正旺, 陈晓端, 等. 2006. 白冠长尾雉(*Syrnaticus reevesii*)卵壳的超微结构及元素组成研究. *北京师范大学学报: 自然科学版*, 42(1): 78–82.
- 蒋志刚, 江建平, 王跃招, 等. 2016. 中国脊椎动物红色名录. *生物多样性*, 24(5): 500–551.
- 林远锋, 鲁长虎, 许鹏, 等. 2021. 1976 年以来丹顶鹤在我国分布变迁及就地保护状况. *南京林业大学学报: 自然科学版*, 45(6): 200–208.
- 罗金明, 王永洁, 王文锋, 等. 2017. 食物资源的枯竭对丹顶鹤营位的影响. *应用生态学报*, 28(7): 2315–2320.
- 孙嘉晨, 曹伊凡, 赵亮. 2014. 高寒草甸常见雀形目鸟类的卵壳特征. *动物学杂志*, 49(6): 841–851.
- 吴庆明, 杨宇博, 邹红菲, 等. 2017. 扎龙保护区春季丹顶鹤觅食的农田生境利用分析. *生态学报*, 37(9): 3212–3217.
- 杨志宏, 邹红菲, 高忠燕, 等. 2015. 食物可获得性对冬季丹顶鹤能量收支的影响—以扎龙自然保护区人工辅助繁育丹顶鹤为例. *生态学报*, 35(13): 4408–4415.
- 杨志宏, 邹红菲. 2020. 取食玉米行为对散放丹顶鹤繁殖期能量摄入及卵壳特征的影响. *野生动物学报*, 41(3): 648–654.
- 张婷婷, 彭昭杰, 周大庆, 等. 2019. 我国丹顶鹤栖息地选择研究进展. *动物学杂志*, 54(1): 134–144.
- 朱曦, 杨士德, 邵小平. 2000. 四种鹭卵壳的超微结构. *动物分类学报*, 25(1): 116–119.