

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫

成果報告

期中進度報告

艾氏樹蛙親子關係分析及親代撫育之研究(3/3)

Parentage Analysis and Parental Care of *Chirixalus eiffingeri* (3/3)

計畫類別： 個別型計畫  整合型計畫

計畫編號：**NSC 94-2311-B-029-001**

執行期間：中華民國 94 年 8 月 1 日至 95 年 10 月 31 日

計畫主持人：關永才（私立東海大學生命科學系 教授）

計畫參與人員：陳怡惠（國立臺灣大學動物學研究所 研究生）

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告  完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

赴國外出差或研習心得報告一份

赴大陸地區出差或研習心得報告一份

出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份

國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、  
列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年  二年後可公開查詢

執行單位：東海大學生命科學系

中 華 民 國 九 十 六 年 一 月 三 十 日

## 中文摘要

本研究計畫是以艾氏樹蛙(*Chirixalus eiffingeri*)為對象，利用野外觀察了解艾氏樹蛙雄、雌蛙所採用的親代撫育行為，並藉由微隨體(microsatellite)DNA 分子遺傳標記鑑定提供撫育的親代及被撫育子代的親子關係，並探討親代撫育的策略。首先，我們以自行建立部分基因組資料庫的方式，得到 11 個可擴增且有多型性的微隨體基因座。整體而言，異結合型之觀察值平均為 0.433；期望值平均為 0.656。每個基因座的對偶基因數目從 2~17 個。這 11 個微隨體的基因座的親子關係鑑定之排除機率，在父母一方之基因型已知時，排除機率為 0.999，而父母雙方之基因型若都未知時，則排除機率為 0.984。其次，我們完成艾氏樹蛙雄蛙護卵行為觀察的野外實驗，結果發現雄蛙護卵頻率在日夜間有差異，夜間頻率比日間高。護卵頻率隨著子代發育期越後期，有顯著下降的趨勢，但護卵頻率與子代數目沒有顯著相關。艾氏樹蛙雄蛙護卵頻率與受精卵孵化率沒有顯著相關，表示卵的存活可能不只受親代護卵行為的影響，其他環境因子可能也佔有相當的影響力。最後，野外觀察發現有些雄蛙會在護卵時鳴叫吸引雌蛙產卵，然後一起照顧兩批不同發育期受精卵。我們以 7 對微隨體基因座為遺傳標記，鑑定三個例子的護卵雄蛙與竹筒中兩批受精卵的親子關係。結果顯示其中兩個例子，護卵雄蛙同是兩批卵的父親，但兩批卵應屬於不同雌蛙的子代。另一個例子發現，發育期較晚的那批卵只有部分的受精卵屬於護卵雄蛙，應是屬於多隻雄蛙的後代，且兩批卵也分屬不同雌蛙的後代。這樣的親子關係分析結果，顯示艾氏樹蛙兩隻母蛙餵食同一竹筒的蝌蚪之親代撫育策略，可能受雄蛙的生殖策略影響。也顯示艾氏樹蛙的交配系統及親代撫育之多樣及複雜性，值得更進一步的探討。

關鍵字：無尾類、微隨體、護卵、親子關係、親代撫育

## Abstract

We conducted field observations on parental care behavior and identified parentage of care providers (male or female frogs) and eggs or tadpoles by microsatellite DNA. First, we developed 11 polymorphic microsatellites as genetic markers for parentage analysis. The number of alleles per locus ranged from 2 to 17. The observed and expected heterozygosity averaged 0.433 and 0.656, respectively. Total exclusionary probability of these loci is 0.984 when no parental genotypes are known, and is 0.999 when one of the parental genotypes is known. The results indicate that these markers should provide sufficient resolution for inferring genetic parentage in *C. eiffingeri*. Next, we conducted field observations on egg attendance in male *C. eiffingeri*. The frequency of egg attendance had a distinct diel pattern in which males were observed to attend eggs more frequently at night than during the day. Attendance frequency significantly decreased with increasing developmental stage of the embryos but it was not statistically significantly related to clutch size. The non-significant relationship between hatching rate and frequency of egg attendance suggests that embryonic survival of *C. eiffingeri* is more than a function of egg attendance, and ecological and environmental factors. Finally, we found that a few male *C. eiffingeri* called and gained another mating while attending eggs which resulted in multiple clutches in the same bamboo stumps. We analyzed the genetic relationships between the attending male and embryos of multiple clutches by 7 polymorphic microsatellite loci. The results showed that in these two cases, two egg clutches were most likely sired by the attending male which mated with two females. In contrast, there was a case where egg clutches were most likely sired by multiple male frogs and two female frogs.

Keyword: anurans, microsatellite DNA, egg attendance, parentage, parental care

# 目 錄

中文摘要.....	I
Abstract .....	II
緣由與目的.....	1
材料與方法.....	3
結果與討論.....	5
參考文獻.....	6
附表與圖.....	..9

## 緣由與目的

兩生類(amphibia)的無尾類(anura)在從水域入侵陸域過程中，演化出多種適應的方法，其中最重要的是生殖方式的適應：從卵泡、樹上產卵、體內受精、到直接變態等(Duellman and Trueb, 1986)。如此多樣的適應方法中，把卵及蝌蚪放置在樹上積水池(phytotelmata)是非常特殊的生殖方式(Duellman and Trueb, 1986; Ueda, 1986; Lannoo *et al.*, 1987)。樹上積水池(如：樹洞、竹筒)是一個水量少、溶氧低的環境，且為無大型昆蟲或無脊椎動物等食物來源的低基礎生產率之微棲地(Laessle, 1961; Wassersug *et al.*, 1981; Lannoo *et al.*, 1987)。因此，許多在樹洞生殖的種類演化出多樣的親代撫育的行為來增加子代的存活率(Wells, 1981)。

生活在樹上的卵可以減少被掠食的機會，但水分的來源則相對的不足。成蛙在卵孵化期間提供護卵行為，是其中一種因應的方式。成蛙護卵的功能為可以提供水分給卵使之正常發育、減低卵被其他掠食者或同類成體掠食的機會、減少卵被菌類感染及移除發育異常的卵(Wells, 1981; Simon, 1983; Townsend *et al.*, 1984; Crump, 1995)。而生活在樹洞的蝌蚪也面臨食物來源不足的問題。因此，有許多種類演化出食卵的習性。至今已知至少有 7 種箭毒蛙科及 9 種非箭毒蛙科的種類，有餵卵給蝌蚪吃的行為(McDiarmid, 1978; Weygoldt, 1980; Wassersug *et al.*, 1981; Ueda, 1986; Lannoo *et al.*, 1987; Weygoldt, 1987; Brust, 1990; Thompson, 1992; Brust, 1993; Jungfer, 1996; Kam *et al.*, 1996; Caldwell, 1997)。蝌蚪以吃卵(oophagy)來解決食物的不足在演化及生態上是非常有趣的問題。卵通常是動物作為繁殖後代用的(即是讓之受精後發育成後代)，但母蛙產卵也用來餵食後代作為撫育的功能。卵既是後代，也是後代的食物，這是在脊椎動物的生殖策略的演化上是非常少見，也是非常奇特的。因此，是一個絕佳的生物體裁去探討有關撫育的生態及演化問題。

分布在台灣及琉球群島的西表島(Iromote Is.)和石垣島(Ishigaki Is.)(呂 and 陳, 1982; Ueda, 1986)的艾氏樹蛙(*Chirixalus eiffingeri*)，是台灣目前所知唯一利用樹上積水池生殖且具有特殊親代撫育行為之兩棲類動物，正是研究親代撫育的最佳模式動物。樹蛙科(Rhacophoridae)的艾氏樹蛙，其生殖方式是雌蛙及雄蛙在樹上樹洞或竹筒交配後，將受精卵一顆顆地黏在樹上集水池上方的內壁。在受精卵 10-14 天的發育期間，雄蛙會駐留竹筒看護卵(莊, 1988; Kam *et al.*, 1996)。因為蝌蚪是絕對性食卵(obligatory oophagy)(Kam *et al.*, 2000)，因此，當蝌蚪孵化掉入集水池生活後，雌蛙會定時回來餵食未受精卵給蝌蚪吃，直到蝌蚪變態離開為止(Ueda, 1986; Kam *et al.*, 2000)。其親代撫育方式是由雌、雄蛙分別在子代的不同發育時期負擔，受精卵時期由雄蛙擔任護卵的工作，而蝌蚪的餵食則由雌蛙擔任。

艾氏樹蛙雄蛙在交配過後會有駐留竹筒的行為。以往陸棲或樹棲蛙類研究發現，雄蛙護卵的行為有：以腹部趴在卵上(brooding)、吃掉或移除受感染或不正常的卵以及抵禦外來者(Wells, 1981; Simon, 1983; Townsend *et al.*, 1984; Crump, 1995)。在艾氏樹蛙的雄蛙撫育行為研究方面，前人僅止於觀察到部分雄蛙在受精卵發育期間會有駐留在竹筒內的行為，但對艾氏樹蛙雄蛙提供護卵行為有哪些？護卵行為的功能為何？則未曾有更進一步

的觀察與研究。

護卵行為會增加雄蛙的生殖成功率，但卻也可能會讓雄蛙覓食機會減少、被掠食機會增加及交配機會減少，因此親代必須權衡付出的撫育時間與能量是否值得。理論上雄蛙應只會照顧自己的子代而避免照顧其他雄蛙的子代，也就是說當雄性親代對這批子代是自己後代的確定性較高時(confidence of paternity)，撫育意願子代與付出也會較高，反之亦然(Westneat and Sherman, 1993; Whittingham *et al.*, 1993)。在艾氏樹蛙的野外觀察中，曾發現交配時有多隻雄蛙在同一竹筒競爭一隻雌蛙，然而，通常卻只有一隻雄蛙會留下來繼續照顧受精卵(Kam *et al.*, 1996)。這隻負擔撫育的雄蛙是唯一交配成功的那隻雄蛙，或者牠只是交配成功的其中一隻雄蛙目前無法知道。以撫育能量與代價的的權衡來看，在竹筒中照顧卵的那隻雄蛙應是全部或大部分蝌蚪的父親。

以本身生產的卵當作子代唯一的食物來源是相當特殊的親代撫育，除了兩棲類，在各類動物中都是未曾發現過的。然而卵對雌蛙來說，可以受精產生子代來增加子代數目，提高本身的生殖成功率，又必須是子代食物來源，親代必然需權衡卵要交配授精或餵食蝌蚪才有較大的生殖成功率。餵食蝌蚪對雌蛙來說是需付出相當多的能量。以美洲的箭毒蛙 *D. pumilio* 來說，雌蛙一次約產 7 顆受精卵，其受精卵在落葉堆孵化成蝌蚪後，由雌蛙揹在背上移到樹上的集水池中放置，一個集水池只放一隻蝌蚪，雌蛙一次照顧 5-7 隻左右的蝌蚪(Brust, 1993)。在撫育蝌蚪期間，因為撫育一批蝌蚪就消耗了非常多的能量，要同時餵食兩批蝌蚪，更是能量上不足以負荷的，因此箭毒蛙雌蛙並不會再一次交配產卵受精(Brust, 1993)。

相對於 *D. pumilio* 來說，艾氏樹蛙所需付出的撫育能量更是大的多。在實驗室的餵食實驗中，發現一隻艾氏樹蛙蝌蚪在蝌蚪期可吃 87 顆卵(Kam *et al.*, 1996)，以野外每個竹筒平均孵出 26.6 隻蝌蚪來看(林, 1996)，一隻雌蛙要養活這些蝌蚪，必須在一個半至二個月的蝌蚪期生產非常大量的卵來餵食蝌蚪。這對一隻吻肛長平均只有  $36.1 \pm 6.8$  mm(林, 1996)的雌蛙來說，絕對是非常耗能的一項工作，雌蛙如何能解決或改善撫育能量不足之問題是非常值得研究的。Kam *et al.*(2000)曾在野外以陷阱捕捉進入竹筒餵食的雌蛙，發現會有兩隻雌蛙在同一竹筒餵食的情形。因此，艾氏樹蛙的雌蛙可能利用其他撫育策略來減輕撫育的負擔，例如以合作撫育同一個巢的蝌蚪 (cooperative brooding)，或是有其他雌蛙當幫助者 (helpers)，或者會有雌蛙將子代寄生(brooding parasitism)給其他雌蛙照顧。而只利用野外觀察或陷阱捕捉(Kam *et al.*, 2000)的方式，並不能確定雌蛙與蝌蚪間遺傳上的親子關係，因此也就無法釐清雌蛙的撫育策略。

過去對艾氏樹蛙的研究主要是以野外觀察及操縱性實驗來探討護卵及撫育行為的相關主題，唯只靠這些方法有其先天性的困難，因為：(1)其生殖活動是在晚上進行，不易觀察；(2)個體間的辨識十分不易；(3)在生殖季中不易觀察到所有的交配及撫育行為；(4)觀察到交配行為並無法鑑別出交配是否成功及是否真有基因的傳遞，因此無法確定撫育者與子代在遺傳上的關係，也就無法釐清撫育策略的生態及演化意義。可幸的是，近年來分子遺傳標記快速的發展，對艾氏樹蛙親代撫育研究是一重要的契機。

在近一、二十年已有相當多利用分子遺傳標記(molecular genetic maker)在動物親子關係鑑定的研究(Queller and Goodnight, 1989; Queller *et al.*, 1993; Avise, 1994; Avise *et al.*,

2002)。並在許多動物的交配系統及行為生態上，有許多不同於以往直接觀察的結果出現。許多的研究中，原本觀察認定是一夫一妻制的種類，經過分子遺傳標記鑑定的結果，發現其實有很高的配對外交配行為(extra-pair mating)，顛覆了許多舊有的交配系統研究結果(Hughes 1998)。而在野外不易觀察到交配行為的種類也因分子遺傳標記的發展，累積了相當多的新的研究成果，最近幾年在魚類的研究就是最佳的例子(Avise *et al.*, 2002)。這些新發現對動物行為生態及演化都是極為重要的貢獻。用來鑑定親屬(kinship)與親子關係(parentage)的遺傳標記有許多種，而微隨體是現今最適合也最廣泛被利用在野生動物研究上的分子遺傳標記(Queller *et al.*, 1993; Westneat and Webster, 1994)。因此，本研究採用微隨體為遺傳標記來做親子關係鑑定。

本研究計畫利用 DNA 分子遺傳標記技術，結合野外觀察及實驗，探討艾氏樹蛙雄、雌蛙所採用的親代撫育行為、及竹筒中受精卵或蝌蚪的和成體的親緣關係，藉此了解親代撫育在生殖策略、交配系統的生態及演化意義。

## 材料與方法

### 1. 實驗樣區

實驗在南投縣鹿谷鄉臺大實驗林溪頭營林區的竹林進行。該處位於北緯 $23^{\circ}39'20''$ ，東經 $120^{\circ}48'10''$ ，海拔約1,016公尺，年平均溫度約 $17^{\circ}\text{C}$ ，年雨量約為3,000公釐。其雨量分佈是有明顯的雨季高峰，集中於每年的2至9月，此時期正是艾氏樹蛙的生殖季。實驗區以孟宗竹(*Phyllostachy edulis*)和麻竹(*Sinocalamus latiflorus*)組成的竹林為主。竹子因工藝或建材需要會定期砍伐，砍伐之後剩餘的部分則形成竹筒。雨季時，竹筒便聚集雨水形成小積水池，成為艾氏樹蛙相當理想的生殖場所(Kam *et al.*, 1996)。

### 2. DNA 萃取

基因體(genomic)DNA 之萃取為將艾氏樹蛙組織，先用剪刀剪碎，加入 2 毫升(ml)的溶解緩衝液(lysis buffer; 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 200 mM NaCl, 1% SDS, pH 8.0)及 50 $\mu\text{l}$  蛋白質溶解酵素(Proteinase K; 10mg/ml)。混合均勻後，置於 $55^{\circ}\text{C}$ 水浴加熱至組織完全溶解。最後加入 20 $\mu\text{l}$  RNA 分解酵素(RNase, 10mg/ml)在 $55^{\circ}\text{C}$ 水浴中作用 1 小時。接著利用標準酚-氯仿(phenol-chloroform)萃取步驟萃取 DNA(Sambrook *et al.*, 1989)。萃取出來的 DNA 溶解於 TE 緩衝溶液(10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0)中，保存於 $-20^{\circ}\text{C}$ 冰箱備用。

### 3. 微隨體基因座的篩選、可擴增性及多型性

建立微隨體部分基因組資料庫的方法是經由設計一或多個的限制內切酶(restriction enzyme)，將樣本的基因體 DNA 切成 300-700bp 的小片段，再利用純化後的片段與質體

或噬菌體(如：PUC18、M13)之載體(vector)接合(ligate)，接著將載體轉殖(transform)至菌株(如：大腸桿菌)中。培養菌株後，利用重複序列為 AC<sub>15</sub>、TC<sub>15</sub>、AT<sub>15</sub>、AAT<sub>10</sub>、ACG<sub>10</sub>、GACA<sub>6</sub>及 TC(TTC)<sub>5</sub> 等有化學物標記的探針(repeat sequence probe)，當作雜合反應(hybridization)的標的(target)，與菌株進行雜合反應，將有訊息反應的菌株進行定序，找出微隨體基因座的序列(廖, 1999)。完成微隨體基因座的定序後，即可利用程式 Primer3 ([http://www-genome.wi.mit.edu/genome\\_software/other/primer3.html](http://www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html)) (Rozen and Skaletsky, 2000)在基因座兩側設計 PCR 引子。

以粹取的艾氏樹蛙基因體DNA為模版(template)，利用所設計的引子，分別做PCR反應(polymerase chain reaction)的溫度及藥品濃度等條件測試，PCR產物以自動定序儀(automated sequencer) MegaBase 500 (GE)做基因型定型(genotyping)，篩選出可擴增(amplify)且具多型性(polymorphism)的微隨體基因座。

#### 4. 微隨體基因座資料分析

以程式 MSA (Dieringer and Schloetterer 2003)計算艾氏樹蛙每個微隨體基因座的對偶基因數目，及其異結合同型觀察值(observed heterozygosity, Ho)及異結合同型期望值(expected heterozygosity, He) (Nei, 1978)。另以 GENEPOP version 3.3 (Raymond and Rousset, 1995)計算基因座是否符合哈溫平衡(Hardy-Weinberg expectation)與連鎖不平衡(linkage disequilibrium)。最後以 CERVUS (Marshall *et al.*, 1998)計算微隨體基因座之親子關係鑑定排除機率。

#### 5. 雄蛙護卵行為觀察及樣本採集

生殖季開始後，每週巡查實驗地內的所有竹筒。若發現竹筒壁上有受精卵，記錄受精卵數目及發育期。並查看是否有雄蛙在竹筒中，若有，則紀錄雄蛙的位置及行為。之後，一天去查看實驗地所有有受精卵的竹筒4至5次，觀察雄蛙的位置及行為，記錄受精卵數及發育期，並觀察是否有其他雄蛙或其他生物進入竹筒。雄蛙的撫育行為觀察持續進行至受精卵孵化為蝌蚪掉入竹筒中(約10-14天後)或死亡為止，紀錄孵化成功的蝌蚪數、死亡受精卵數及死亡原因(如：乾死、淹水、發霉等)。

由於雄蛙行為可能因為研究者的出現而干擾，我們以V8架設於有雄蛙在的竹筒，以記錄雄蛙在竹筒中的護卵的行為表現。最後我們用剪趾法(toe-clipping)採樣竹筒中護卵雄蛙的趾頭，並採集竹筒壁上的受精卵，保留在95%酒精中，作為雄蛙與受精卵的親子鑑定之用。

#### 6. 基因型定型與親子關係鑑定

以成蛙趾頭組織及受精卵樣本萃取的 DNA 為模版，利用篩選出的微隨體基因座之引子做 PCR。PCR 產物再以自動定序儀做基因型判讀後，鑑別護卵雄蛙與竹筒中受精卵的親子關係。



## 結果與討論

### 1. 微隨體基因座的篩選

針對溪頭族群中的艾氏樹蛙個體，獲得可擴增且有多型性的微隨體的基因座共11個。基因座特性如Table 1所列。11個基因座的對偶基因數目從2~17個，平均為7.27。異結合同型觀察值平均為0.433，期望值平均為0.656。有6個基因座的異結合同型觀察值顯著偏離哈溫平衡( $P < 0.01$ ) (table 1)，其中5個是因為異結合同型缺少(heterozygote deficiency)而1個(Ced08767)是因為異結合同型過剩(heterozygote excess) (Table 1)。偏離哈溫平衡可能是因為我們的樣本來源侷限於一塊小的竹林地，因此有一些程度的近親交配(inbreeding)。此外，樣本數不多及無效的對偶基因(null alleles)存在也是可能的因素。

基因座間的連鎖不平衡測試為不顯著( $P > 0.01$ )，顯示個別基因座可視為獨立的遺傳標誌。以電腦程式CERVUS作親子關係鑑定之排除機率。整體11個微隨體基因座，在父母一方之基因型已知時，排除機率可達0.999，而父母雙方之基因型若都未知時，則排除機率為0.984 (table 1)。結果顯示應足以作為親子關係鑑定之用。

篩選出的11個艾氏樹蛙微隨體基因座，已發表於2005年的Molecular Ecology Notes (SCI)(附錄一)。

### 2. 雄蛙的護卵行為

根據59天的野外觀察資料顯示，護卵工作皆是由雄蛙執行。在所有有卵竹筒的觀察中，雄蛙的護卵頻率約只有27%。雄蛙護卵的頻率在日夜間有顯著差異，夜間護卵頻率(約35%)較白天頻率(約20%)高(Wilcoxon matched-pairs signed-ranks test,  $Z = -7.250$ ,  $P < 0.001$ ,  $n=254$ ; Fig. 1)。此外，雄蛙護卵頻率隨卵的發育期越後期而顯著降低(GLM,  $F_{1, 244} = 8.71$ ,  $P = 0.0002$ ,  $n = 250$ ; Fig. 2)。但護卵頻率與卵數則沒有顯著相關(GLM,  $F_{1, 244} = 0.59$ ,  $P = 0.4423$ ,  $n = 250$ ; Table 2)。

我們以V8錄了104.3小時的雄蛙在竹筒中護卵的行為表現。結果發現有 $34.3 \pm 26.4\%$  ( $n = 14$ )的時間，雄蛙在執行以腹部主動濕潤卵塊各部位。濕潤卵的行為推測與防止受精卵乾燥有關。然而，我們的結果顯示雄蛙護卵頻率與受精卵的孵化率沒有顯著相關(Fig. 3)。表示卵的存活及孵化率可能不只受親代護卵行為的影響，其他生態與環境因子，如：氣候及微棲地的環境因子對卵的孵化率可能也佔有相當的影響力。

艾氏樹蛙雄蛙護卵的行為生態學研究，已被期刊Zoological Science (SCI)接受(附錄二)。

### 3. 護卵雄蛙與受精卵的親子關係判定

在艾氏樹蛙夜間活動觀察中，發現有雄蛙在護卵的同時一邊鳴叫吸引雌蛙，且在同一個竹筒獲得第二窩的卵。對雄蛙來說，邊護卵邊鳴叫應該可以降低因為執行親代撫育而降低交配機會的損失。然而，相較於沒有護卵的雄蛙，絕大多數艾氏樹蛙雄蛙在護卵在期間，會明顯降低鳴叫頻率。而野外也只有發現3.9%的竹筒會有兩窩不同時期的卵。

因此，大多數艾氏樹蛙雄蛙並不會採用在護卵並同時鳴叫以吸引配偶的生殖策略。我們利用微隨體為分子遺傳標記，檢測三個竹筒中，護卵雄蛙與兩窩不同發育期的卵之親子關係。其中兩個竹筒的結果顯示，兩窩不同發育期的卵之父親皆是護卵的雄蛙，但屬於不同雌蛙的後代(case 01 and 02; Table 3)。其中一個竹筒(case 03; Table 3)的結果則發現，護卵的雄蛙是後產卵的那窩的卵之父親，但較早產卵的那一窩，有部分卵是不屬於護卵的雄蛙的子代，而兩窩卵也屬於不同雌蛙的後代。

這樣的結果顯示雄蛙在護卵的同時鳴叫，應是吸引到不同的雌蛙在同一竹筒產卵。雄蛙這樣的生殖策略，理論上會造成兩個雌蛙回到同一個竹筒餵食蝌蚪之親代照顧型式。而同一發育期的卵不屬於一個父親的子代，則推測可能是一雌多雄的假交配型式造成。但是關於野外有多少比例的受精卵屬於一雌多雄的交配所產生，這樣的交配型式對雄蛙的護卵行為又會有什麼影響，則需更多的行為觀察及親子關係分析研究才能得知。

#### **4.結語**

本計劃是第一個利用分子遺傳標記，探討在樹洞產卵、並具有雄蛙護卵及母蛙餵卵撫育的種類之親子關係之研究。本研究計畫以三年時間，利用DNA分子遺傳標記技術，結合野外觀察及實驗，探討艾氏樹蛙的親代撫育行為、及竹筒中受精卵（或蝌蚪）的和成體的親緣關係，藉此了解親代撫育及生殖策略的行為生態。本研究結果讓我們對雄蛙護卵行為模式及功能有初步的了解，但還有許多有趣或新的現象卻有待進一步的探索。親子關係分析結果亦顯示出艾氏樹蛙的生殖策略、交配系統及親代撫育之多樣及複雜性，值得更進一步的探討，研究之成果將有助於了解無尾類親代撫育的生態及演化意義。

#### **參考文獻**

- Avise JC (1994) Molecular markers, natural history and evolution. Chapman & Hall, Inc., New York, USA.
- Avise JC, Jones AG, Walker D, DeWoody JA (2002) Genetic mating systems and reproductive natural histories of fishes: lesson for ecology and evolution. *Annu Rev Genet* 36: 19-45.
- Brust DG (1990) Maternal brood care by *Dendrobates pumilio*: a frog that feeds its young. Ph.D. dissertation, Cornell University.
- Brust DG (1993) Maternal brood care by *Dendrobates pumilio*: a frog that feeds its young. *J Herpetol* 27: 96-98.
- Caldwell JP (1997) Pair bonding in spotted poison frogs. *Nature* 385: 211.
- Crump M (1995) Parental care. In: *Amphibian biology*. Vol. 2. Social behaviour (eds. Heatwole H, Sullivan BK), pp. 518-567. Surrey Beatty and Sons, Chipping Norton,

- New South Wales, Australia.
- Duellman WE, Trueb L (1986) Biology of amphibians. McGraw-Hill, New York, USA.
- Jungfer KH (1996) Reproduction and parental care of the coronated treefrog, *Anotheca spinosa* (Steindachner, 1864) (Anura: Hylidae). *Herpetologica* 52: 25-32.
- Kam Y-C, Chen T-C, Chen Y-H, Tsai I-R (2000) Maternal brood care of an arboreal breeder, *Chirixalus eiffingeri* (Anura: Rhacophoridae) from Taiwan. *Behaviour* 137: 137-151.
- Kam Y-C, Chuang Z-S, Yen C-F (1996) Reproduction, oviposition-site selection, and tadpole oophagy of an arboreal nester, *Chirixalus eiffingeri* (Rhacophoridae), from Taiwan. *J Herpetol* 30: 52-59.
- Laessle AM (1961) A micro-limnological study of Jamaican bromeliads. *Ecology* 42: 499-517.
- Lannoo MJ, Townsend DS, Wasswessug RJ (1987) Larval life in the leaves: arboreal tadpole types, with special attention to the morphology, ecology, and behavior of the oophagous *Osteopilus brunneus* (Hylidae) larva. *Fieldiana Zool, New Series* 38: 1-31.
- Marshall TC, Slate J, Kruuk LE, Pemberton JM (1998) Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Mol Ecol* 7: 639-655.
- McDiarmid RW (1978) The evolution of parental care in frogs. In: *The development of behavior: comparative and evolutionary aspects* (eds. Burghardt GM, Bekoff M), pp. 127-147. Sceece publisher, Inc., Enfield, NH, USA.
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- Queller DC, Goodnight KF (1989) Estimating relatedness using genetic markers. *Evolution* 43: 258-275.
- Queller DC, Strassmann JE, Hughes CR (1993) Microsatellite and kinship. *Trends Ecol Evol* 8: 285-288.
- Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP (Version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J Hered* 86: 248-249.
- Rozen S, Skaletsky HJ (2000) Primer 3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: *Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology* (eds. Krawetz S, Misener S), pp. 365-386. Humana Press, Totowa, NJ.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory Manual*. 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Simon MP (1983) The ecology of parental care in a terrestrial breeding frog from New Guinea. *Behav Ecol Sociobiol* 14: 61-67.
- Taberlet P, Griffin S, Goossens B, *et al.* (1996) Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucleic Acids Res* 24: 3189-3194.
- Thompson TL (1992) Reproductive behaviors and larva natural history of the Jamaican brown frog, *Osteopilus brunneus* (Hylidae). M.S. thesis, University of Florida.
- Townsend DS, Stewart MM, Pough H (1984) Male parental care and its adaptive significance

- in a neotropical frog. *Anim Behav* 32: 421-431.
- Ueda H (1986) Reproduction of *Chirixalus eiffingeri* (Boettger). *Sci Rep of Lab Amphibian Biol, Hiroshima Univ* 8: 109-116.
- Wassersug RJ, Frogner KJ, Inger RF (1981) Adaptations for life in tree holes by rhacophorid tadpoles from Thailand. *J Herpetol* 15: 41-52.
- Wells KD (1981) Parental behavior of male and female frogs. In: *Natural selection and social behavior: recent research and new theory* (eds. Alexander RD, Tinkle DW), pp. 184-197. Chiron Press, New York.
- Westneat DF, Sherman PW (1993) Parentage and evolution of parental care. *Behav Ecol* 4: 66-77.
- Westneat DF, Webster MS (1994) Molecular analysis of kinship in bird: interesting questions and useful techniques. In: *Molecular ecology and evolution: approaches and applications* (eds. Schierwater VB, Streit B, Wagner GP, DeSalle R). Birkhäuser, Basel; Boston.
- Weygoldt P (1980) Complex brood care and reproductive behavior in captive poison-arrow frogs, *Dendrobates pumilio* O. Schmidt. *Behav Ecol Sociobiol* 7: 329-332.
- Weygoldt P (1987) Evolution of parental care in dart poison frogs (Amphibia, Anura, Dendrobatidae). *J Zool Syst Evol Res* 25: 51-67.
- Whittingham LA, Dunn PO, Robertson RJ (1993) Confidence of paternity and male parental care: an experimental study in tree swallows. *Anim Behav* 46: 139-147.
- 呂光洋, 陳世煌 (1982) 台灣的兩棲類. 山苑出版.
- 林春 (1996) 艾氏樹蛙母蛙的生殖投資與其蝌蚪的族群生態學. 碩士論文, 國立台灣大學.
- 莊國碩 (1988) 艾氏樹蛙生殖生物學之研究. 碩士論文, 國立台灣師範大學.
- 廖郁英 (1999) 半穴居短尾鮑微體基因座及其親族關係. 碩士論文, 國立台灣師範大學.

Table 1 Characteristics of 11 polymorphic microsatellite loci in *Chirixalux eiffingeri*. i, interrupted repeat motif; H<sub>o</sub>, observed heterozygosity; H<sub>e</sub>, expected heterozygosity; HWE, Hardy-Weinberg equilibrium; PE<sub>1</sub> and PE<sub>2</sub>, exclusion probabilities without information of parents and with one known parent, respectively; T<sub>a</sub>: annealing temperature; N: sample size.

Locus (GenBank ID)	Repeat motif	Primer sequences(5'-3')*	T <sub>a</sub> (°C)	N	Allele Size range (bp)	No. of alleles	H <sub>o</sub>	H <sub>e</sub>	HWE P value	PE <sub>1</sub>	PE <sub>2</sub>
CEr00112 (AY853675)	i(TG) <sub>12</sub>	GCAAAGAGGAGGCAGCAAAT GCTTGGCAAACAGGTTACTT <sup>HEX</sup>	58.0	20	81-91	9	0.550	0.688	0.127	0.282	0.466
CEr00006 (AY853676)	i(GA) <sub>88</sub>	ACATCCATGCTCATGCTCTG CCAATGACAAAGTTGGGGTT <sup>FAM</sup>	60.0	16	267-297	9	0.250	0.700	0.000	0.295	0.484
CEr00009 (AY853677)	i(GA) <sub>56</sub>	TCTGCATCCAAGTACAGGCTT <sup>TAMRA</sup> GCCATGATGACCAACACCTA	56.5	19	224-290	12	0.526	0.836	0.000	0.483	0.655
CEr00118 (AY853678)	i(GA) <sub>27</sub>	CCTGGTGTGAGGGTTTSTA AACACATACCGTGTCTTTCGC <sup>HEX</sup>	56.5	14	135-189	4	0.286	0.537	0.033	0.139	0.277
CEd02641 (AY853679)	i(AC) <sub>9</sub> , (CT) <sub>24</sub>	GTGTATCGCTTCCCCCTTC <sup>TAMRA</sup> TCCAGATTCTAGCGGCTCTG	56.0	16	258-280	6	0.500	0.734	0.126	0.314	0.497
CEd02747 (AY853680)	i(TCC) <sub>11</sub>	AGTGATGCCCGTAACCTGAT <sup>FAM</sup> TCAGGCCAGTCATTACAAG	56.0	21	203,212	2	0.143	0.136	1.000	0.009	0.062
CEd06009 (AY853681)	(AC) <sub>8</sub>	AAGTTAACCTTGCAATGTCG <sup>HEX</sup> TGCCTTGTCTCCCCTAGAC	58.0	17	88-96	6	0.294	0.569	0.001	0.177	0.355
CEd08767 (AY853682)	i(GA) <sub>5</sub> , (GT) <sub>6</sub> , (GT) <sub>8</sub>	ATATCAGTGCCCCAGTGACG <sup>HEX</sup> GCGGGAGATTGAAGATGCT	56.0	20	243,251	2	0.800	0.492	0.005	0.115	0.182
CEd09258 (AY853683)	i(GA) <sub>92</sub>	GGCTCTCACATCACAAAA <sup>TAMRA</sup> CTTACCTGTATGGGCCAGTT	52.0	5	364-370	4	0.000	0.800	0.003	0.298	0.472
CEd12365 (AY853684)	(CT) <sub>24</sub>	GGCCTCTCCACACAAGTT <sup>HEX</sup> CAGTGCCAGCCCTCAT	53.0	24	88-120	9	0.875	0.816	0.167	0.439	0.616
CEd15688 (AY853685)	(GT) <sub>16</sub>	GAAAACCTGCAGCCAAACC <sup>TAMRA</sup> TTGTGTGCAATGTGAAGTCAAC	60.0	24	82-128	17	0.542	0.902	0.000	0.625	0.769
Overall							0.433 <sup>#</sup>	0.656 <sup>#</sup>		0.984	0.999

\* Primer labeled with fluorescent dye: FAM, HEX or TAMRA # Average across loci

Table 2. The result from a General Linear Model (GLM) of ranked attendance frequency in relation to developmental stage and clutch size in *Chirixalus eiffingeri*.

Source	<i>df</i>	Type III SS	MS	F	Pr> F
Model	5	120976.554	24195.311	5.613	<0.0001
Developmental stage	2	75097.964	37548.982	8.711	0.0002
Clutch size	1	2553.124	2553.124	0.592	0.4423
Stage × clutch size	2	6092.992	3046.496	0.707	0.4942
Error	244	1051717.946	4310.319		

Table 3. Genotypes of the attending male and the embryos of two clutches in the same bamboo stump. Genotypes of the mother are deduced from those of the male and embryos (except for the early clutch in case 02\*). N, Number of embryos with particular genotypes. -, The genotype can not be determined or deduced from the data.

Locus	Attending male	Early clutch			Late clutch		
		embryos	N	Deduced mother	embryos	N	Deduced mother
<b>Case 01*</b>							
<i>CEd12365</i>	92/94	92/94	3	94/94*	88/92	1	88/92
		94/94	4		92/92	2	
					92/94	2	
<i>CEd02641</i>	270/278	270/280	1	-/*	278/278	2	278/-
<i>CEr00009</i>	-/-	236/236	1	236/246*	230/230	2	230/-
<i>CEr0024</i>	110/110	110/110	2	112/112*	110/110	1	112/-
		112/112	1		110/112	1	
<i>CEd13854</i>	114/114	114/120	1	106/120*	114/122	2	122/-
<i>CEd15688</i>	-/-	88/94	1	88/92*	88/88	2	88/-
		92/92	1		88/94	1	
					92/94	1	
<i>CEd14604</i>	-/-	-/-		163/167*	-/-		-/-
<b>Case 02</b>							
<i>CEd12365</i>	92/112	88/92	2	88/94	92/112	5	92/94
		88/112	2		92/92	1	
		92/94	1		92/94	3	
		94/112	5		94/112	3	
<i>CEd02641</i>	258/278	254/258	2	254/278	278/280	1	280/-
		254/278	2				
		278/278	2				
<i>CEr00009</i>	238/238	234/238	10	234/234	228/238	6	228/238
					238/238	6	
<i>CEr00024</i>	122/122	122/122	3	-/-	110/110	4	110/130
					110/122	2	
					122/130	1	
					130/130	1	
<i>CEd13854</i>	-/-	112/112	1	-/-	104/104	2	-/-
		112/130	1		104/112	5	
		122/122	2				
		130/130	3				
<i>CEd14604</i>	-/-	-/-		-/-	167/167	3	-/-
					167/179	2	
					179/179	1	

\*To be continued

Continued

Locus	Attending male	Early clutch			Late clutch		
		embryos	N	Deduced mother*	embryos	N	Deduced mother
<b>Case 02</b>							
<i>CEd15688</i>	-/-	104/104 98/98	2 5	-/-	104/104	5	-/-
<b>Case 03</b>							
<i>CEd12365</i>	92/114	90/92 92/114 92/120 92/92 92/94 94/120 94/94	1 1 1 1 5 1 1	-/-	88/114 88/92 92/114 92/92	3 3 5 5	88/92
<i>CEd02641</i>	-/-	258/278 272/272 272/278 276/278	2 1 1 1	-/-	278/278 278/280	6 2	-/-
<i>CEr00009</i>	232/240	224/224 228/228 228/264 236/240 238/238 240/240	2 1 1 1 4 1	-/-	228/232 228/240 232/240 240/240	5 2 3 3	228/240
<i>CEr00024</i>	-/-	110/110 110/112 112/112 120/120 122/122	3 2 1 2 2	-/-	110/110 110/122 122/122	2 4 7	-/-
<i>CEd13854</i>	-/-	108/110 108/116 108/118 108/122 108/130 110/122	1 1 1 1 2 2	-/-	104/108 108/116 98/104 98/116	3 6 3 3	-/-
<i>CEd15688</i>	96/96	88/108 88/110 88/88 96/108	2 3 3 1	-/-	112/112 96/112 96/96	4 2 7	96/112
<i>CEd14604</i>	-/-	155/163 155/171 155/175 159/159 163/163	1 2 1 1 4	-/-	159/159 159/187 187/187	5 2 2	-/-

\* The mother of the early clutch in case 02 was captured and the genotype of the mother was from genotyping not deducing.



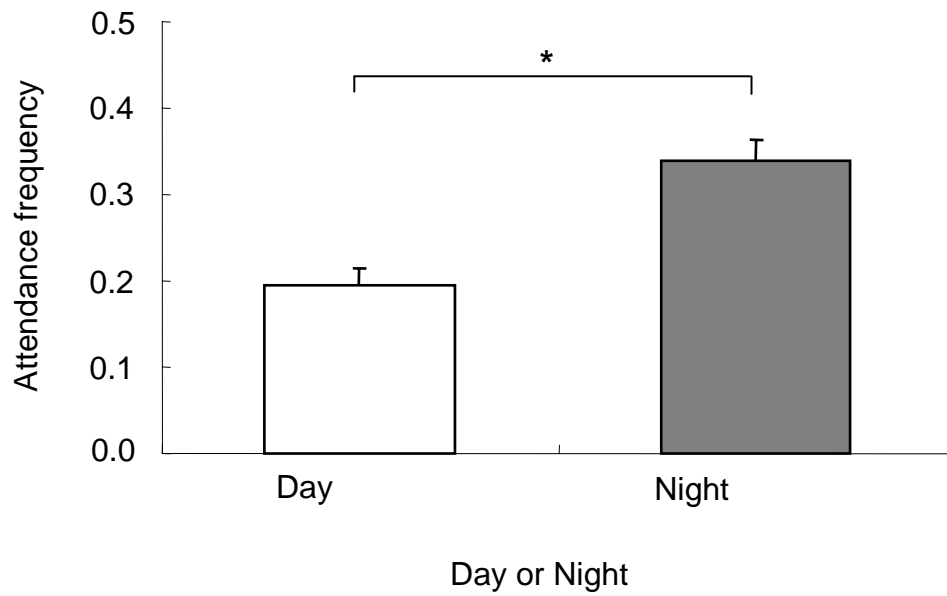


Figure 1. Diel pattern of egg attendance in male *Chirixalus eiffingeri*. The asterisk above the columns indicates that attendance frequencies (mean  $\pm$  SE) in the daytime and nighttime were significantly different (Wilcoxon matched-pairs signed-ranks test,  $P < 0.05$ ).

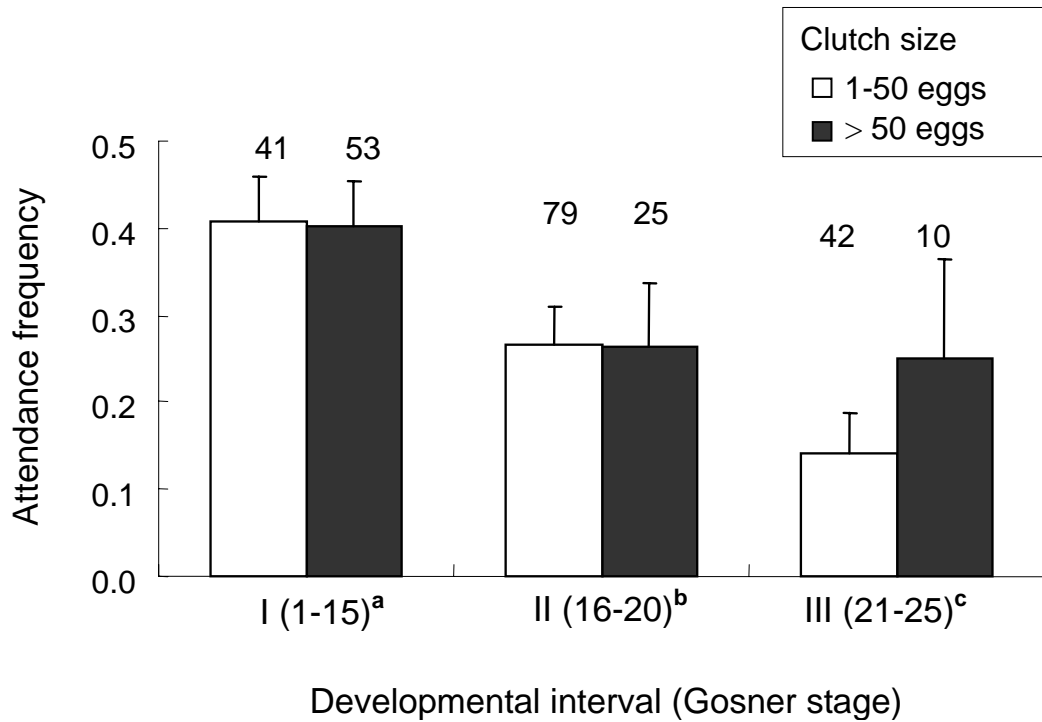


Figure 2. Attendance frequency (mean  $\pm$  SE) of male *Chirixalus eiffingeri* on egg clutches in each developmental interval (as defined by Gosner stages) and clutch size group. Attendance frequencies in three developmental intervals with different superscripts were significantly different (LSD,  $P < 0.05$ ). Numeral above each column indicates sample size.

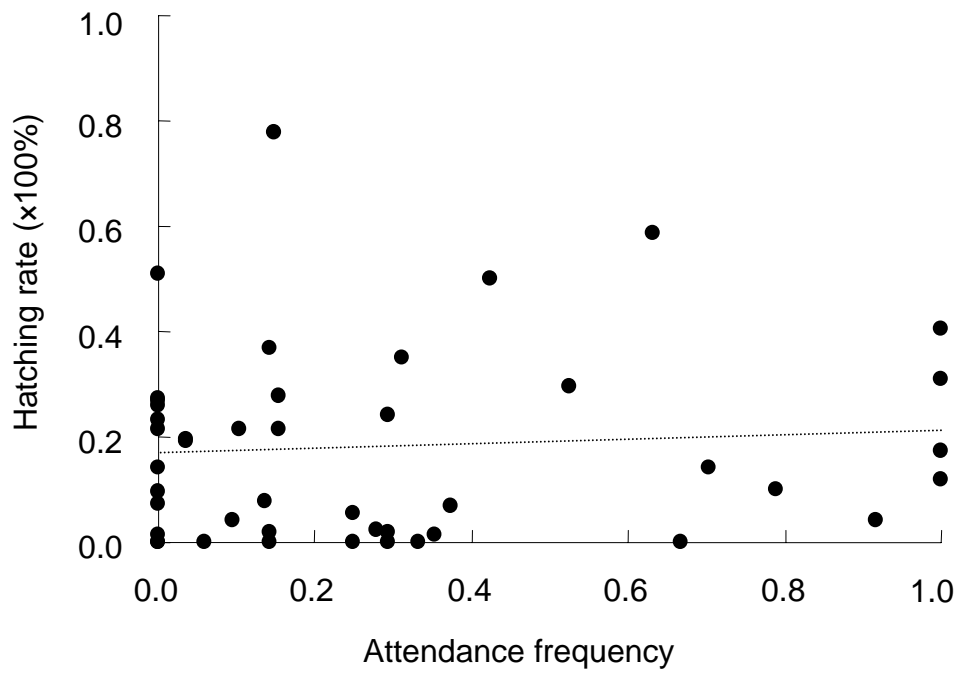


Figure 4. Correlations between hatching rates and male attendance frequencies in egg clutches in *Chirixalus eiffingeri*.