

## 摘要

動物短時間內重複利用舊巢進行生殖可能會導致兩批不同發育期數的子代重疊，確定兩批子代的親子關係有助於了解重複產卵親代撫育行為及其隱含的生殖策略。本研究目的是利用 5 個微衛星基因座作為遺傳標記，分析由野外採集的艾氏樹蛙(*Kurixalus eiffingeri*)重複產卵兩批子代的親子關係。利用 COLONY 2.0 軟體分析 23 窩重複產卵的樣本，結果顯示兩批子代的親子關係共有 8 種組合，以異父異母和部分同父異母的窩數最多(n=7)，推測可能與親代缺乏巢防衛有關。參與產第一批子代的雄蛙再利用同一竹筒與否的比例各佔約 50%，但大部分產第一批子代的雌蛙都不會再利用同一竹筒(73.9%)。導致成蛙再利用竹筒比例的不同，可能是成蛙在面臨好的生殖資源有限及蝌蚪競爭權衡下，成蛙產卵地點選擇的策略不同所造成。此外，雌蛙餵食的間隔時間與生理限制可能是導致雌蛙再利用竹筒比例低的原因。

結合野外雌蛙撫育行為的觀察及親子關係分析的結果顯示：重疊子代有同時由兩批子代的親代餵食，也有只由產第一批子代(蝌蚪)或第二批子代(卵)的親代餵食。因此，艾氏樹蛙重複產卵可能同時具有合作生殖與寄生生殖的策略，且不排除可能存在無親緣關係或親緣關係度低的協助照顧者(helper)。

關鍵字：重複產卵、親子關係、生殖策略、微衛星基因座、艾氏樹蛙

## Abstract

Renesting within a short time span can result in overlapping offspring. To unveil the genetic relationship between parents and offspring is important to understand the reproductive strategies and parental care of adults. The purpose of my study was to identify the genetic relationship between overlapping clutches and adult frogs of *Kurixalus eiffingeri* using five microsatellite DNA markers. The COLONY 2.0 program deduced eight different types of parentage among overlapping offspring in that different parents and partially the same father but different mothers were most abundant (n= 7). A lack of nest defense by adult frogs during larvae period may in part account for the varied patterns of parentage in overlapping offspring. Results of parentage analyses revealed that about equal amount of tadpole-occupied stumps were used by the same or different males, which may be related to the tradeoff between the quality of stumps and inter-clutch competition between tadpoles. In contrast, majority of tadpole-occupied stumps were used by different females (73.9%), which may be related to females' feeding schemes and physiological constraints.

By combining field observation and parentage analyses of overlapping offspring, I found that overlapping offspring can be either fed by the mother of the first or second cohort of offspring, or both mothers. Furthermore, it is possible that the overlapping offspring may also be fed by genetically unrelated females.

Keywords: clutches overlap, parentage, reproductive strategy,  
microsatellite locus, *Kurixalus eiffingeri*

## 前言

生物個體重複利用舊巢進行生殖(re-nesting)是一個普遍的現象。過去研究顯示繁殖親代重複利用舊巢可能是：(1)適合生殖的資源有限(Newton and Marquiss 1982)；(2)提供親代巢選擇的線索，舊巢表示產卵地點有一定的品質(Erckmann *et al.* 1990, Gergely *et al.* 2009)；(3)節省築新巢需要的時間和能量耗費(Cavitt *et al.* 1999)；(4)減少被掠食的風險(Bergin 1997, Watts 1987)。短時間內重複利用舊巢進行生殖可能會導致兩批不同發育期數的子代共存於同一個巢內。共存的兩批子代之親子關係是一個很重要的討論議題，因為它有助於我們了解物種的生殖策略及其生態意義，例如：如果兩批子代為同父母所產，這可能是一種巢忠誠性的表現(nest-site fidelity)(Hoover 2003, Knapp 1993)。由於繁殖親代對舊巢環境的熟悉，重複利用同一個巢進行生殖，可以減少尋找新巢所付出的能量代價或築新巢面臨的掠食風險等(Bergin 1997)。相反的，如果兩批子代為異父母所產，繁殖親代可能是直接根據巢的特性或同種的線索(conspecific cues)等有利的線索判定巢品質的好壞而選擇產卵地點(Doligez *et al.* 2003, Rudolf and Rödel 2005)。

對於具有親代照顧的物種而言，共存的兩批子代之親子關係的釐清更為重要，因為親代照顧需要消耗大量的能量，照顧或餵養沒有親

子關係的子代在演化上是不利的，而且其延伸出的生殖策略更為複雜，例如：如果兩批子代的親子關係為同父母，繁殖親代的生殖策略可能是重複產卵(clutches overlap)，親代可以藉此增加生殖機會及子代數量或減少子代死亡率等提高自己的適存度(Burley 1980, Travis *et al.* 1987)。相反的，如果兩批子代為異父母所產，繁殖親代的生殖策略可能是共同生殖(cooperative breeding)或寄生生殖(brood parasitism)，親代可藉由多個親代共同執行親代照顧或將子代產於其他親代的巢內，由其他親代執行親代照顧而獲益(König 1997, Lyon and Eadie 2008)。

本研究目的是利用微衛星 DNA 標記(microsatellite DNA marker)分析艾氏樹蛙(*Kurixalus eiffingeri*)重複產卵兩批子代的親子關係，藉此探討其生殖策略並初步觀察重複產卵竹筒中雌蛙的撫育行為。艾氏樹蛙為樹蛙科樹棲性的蛙類，主要分布於台灣、西表島和石垣島(Kuramoto 1973, Ueda 1986)。生殖季為每年的三月至八月，交配成蛙會將受精卵產於竹筒內壁的水面上(Kam *et al.* 1996, Kuramoto 1973)，交配後，雄蛙留於竹筒內進行護卵工作約 10-14 天，待卵孵化成蝌蚪後雄蛙便離開竹筒，對竹筒沒有進行防衛(Chen *et al.* 2007, Kam *et al.* 1996)。卵孵化成蝌蚪後，便在竹筒內成長發育直到變態，由於蝌蚪具絕對的食卵性(obligatorily oophagous)，必須仰賴雌蛙提供

的營養卵(trophic eggs)為生(Ueda 1986)。雌蛙每隔 7-8 天回竹筒餵食蝌蚪未受精卵(Kam *et al.* 1997, 2000)，雌蛙完成餵食後便離開竹筒，對於竹筒亦沒有進行防衛。艾氏樹蛙在生殖季的中、後期會出現重複產卵的現象，即第一批子代(蝌蚪)尚未完全變態離開竹筒時，竹筒又被重複利用，進而產生另一批新的卵於竹筒內壁，形成兩批子代(卵和蝌蚪)共存同一竹筒約 4 個星期(Kam *et al.* 1997, Lin *et al.* 2008)，但是兩批子代與親代的關係是未知的，因此確定兩批子代的親子關係有助於了解成蛙的生殖策略及撫育行為。

根據 Lin *et al.* (2008)野外標放的結果顯示，所有護卵雄蛙在卵孵化後皆離開竹筒，而且下一次的生殖都是在另一個竹筒，因此，**本研究假設雄蛙不會利用同一個竹筒進行連續生殖**。Lin *et al.* (2008)推測雄蛙不利用同一個竹筒進行連續生殖，其可以藉由縮短連續兩次交配間距以增加生殖機會，並且減少親子關係近的兩批子代互相競爭資源。另外，對母蛙而言，由於蝌蚪的絕對食卵性，必須依賴雌蛙提供的營養卵為生，若雌蛙拋棄其子代不餵卵，會導致子代因過度飢餓而死亡(Kam *et al.* 1996)。由於蝌蚪期較長約 50 天(Kam *et al.* 1998)，對於雌蛙而言餵食蝌蚪是非常耗能的(Kam *et al.* 1996)，雌蛙為確保子代存活的同时卻也限制其未來的生殖機會。雌蛙餵食可能減少或喪失交配的機會，推測其可能有其他的策略避免或減低餵食所需付出的代價

(Clutton-Brock 1991, Sargent and Gross 1986)。因此，本研究假設雌蛙會重複利用同一竹筒進行生殖，可以同時餵養重複產的兩批子代，以補償其餵食期間喪失的交配機會。

## 文獻探討

### 舊巢的重複利用

繁殖親代重複利用舊巢進行生殖是一個普遍的現象，其中以鳥類的研究為最多(Wada 1994)。過去研究顯示繁殖親代重複利用舊巢可能是：(1)適合生殖的資源有限(Newton and Marquiss 1982)；(2)提供親代巢選擇的線索，表示產卵地點有一定的品質(Erckmann *et al.* 1990, Gergely *et al.* 2009)；(3)節省築新巢需要的時間和能量耗費(Cavitt *et al.* 1999)；(4)減少被掠食的風險(Bergin 1997, Watts 1987)。繁殖親代重複利用舊巢具有兩種形式：利用自己用過的舊巢，這可能是繁殖親代對巢忠誠的表現(Hoover 2003, Knapp 1993)；利用不是自己用過的舊巢，可能是繁殖親代利用巢的特性或同種線索等有利的線索作為產卵地點品質好壞的判定依據而進行巢選擇(Doligez *et al.* 2003, Rudolf and Rödel 2005)。

許多不同動物類群都具有親代對巢忠誠的例子，過去已有研究證實繁殖親代的年紀、產卵地點的品質和個體生殖成功的經驗都是影響親代對巢忠誠性的因素(Knapp 1993, Switzer 1997, Vergara *et al.* 2006)。超過 80% 的白鸛(*Ciconia ciconia*)對巢具有忠誠性(Barbraud *et al.* 1999)，Vergara *et al.* (2006)研究指出前一個生殖季的繁殖成功與否及子代的數量會影響白鸛對巢的忠誠性，生殖成功的親代較不會改變

其繁殖地點。另外，研究也發現年紀會影響白鸛對巢的忠誠度，年長的繁殖親代較不會改變其繁殖地點。研究指出生殖經驗在白鸛對巢忠誠的行為中扮演重要的角色。Knapp (1993)研究發現深裂眶鋸雀鯛 (*Stegastes partitus*)雌魚會根據卵的存活率和掠食者出現與否決定是否繼續使用舊巢，當前一次卵的存活率高時亦提高雌魚對巢的忠誠性，但是若因為掠食者的出現導致卵被掠食而死亡，則會降低雌魚對巢的忠誠性。有一種蜻蜓(*Perithemis tenera*)的繁殖親代也會根據過去的生殖經驗評估巢的品質，親代的生殖成功會增加其對巢的忠誠性 (Switzer 1997)。親代個體對於巢的忠誠性，除了能確保巢的品質好而提高個體的生殖成功外，亦能節省繁殖個體重新築巢或尋找新巢位的時間和能量耗費(Cavitt *et al.* 1999)，而增加其個體的生產力與存活率 (Hoover 2003)。

利用同種線索選擇適合產卵地點的兩棲類計有：艾氏樹蛙(Lin *et al.* 2008)、幾內亞蟾蛙(*Phrynobatrachus guineensis*)(Rudolf and Rödel 2005)、*Pleurodema borellii*(Halloy 2006)和日本林蛙(*Rana japonica*) (Iwai *et al.* 2007)，成蛙會選擇已有同種卵或蝌蚪占據的產卵地點作為生殖場所。雖然利用已有同種蝌蚪或卵存在的產卵地點，子代可能面臨同種密度過高而導致種內競爭或被同種掠食的風險(Dillon and Fiano 2000, Spieler and Linsenmair 1997)，而發育期數較大的子代在資



源競爭上占有優勢，對於發育期數較小的子代之生長發育具有負面的影響(Chen *et al.* 2001, Petranka and Thomas 1995)，但是已有蝌蚪或卵存在的產卵地點可能提供繁殖親代該產卵地點品質有利的線索，以增加子代的存活率(Rudolf and Rödel 2005)。其他物種如：*Aedes triseriatus* (Edgerly *et al.* 1998)、*Culex quinquefasciatus*(Mokany and Shine 2003)、*Ochlerotatus australis*(Mokany and Shine 2003)，雌蚊偏好將卵產於有同種幼蟲的產卵地點。Edgerly *et al.* (1998)發現於樹洞繁殖的雌蚊其產卵策略隨著時間的改變而不同，生殖季早期雌蚊會避免於有同種幼蟲存在的樹洞內繁殖，但是生殖季後期雌蚊則會尋找有同種幼蟲存在的樹洞作為生殖場所。

許多鳥類巢選擇的研究中指出，有些鳥類會根據公眾訊息選擇適合生殖的棲地，即以同種其他個體的生殖成功來評估繁殖地點品質的好壞，作為未來選擇適合繁殖地點的依據(Doligez *et al.*2002)。Ward (2005)研究發現黃頭鳥(*Xanthocephalus xanthocephalus*)前一個生殖季繁殖地點的食物可利用度和成鳥的密度皆無法預期下一個生殖季每隻雌鳥的子代數量，但是，前一個生殖季每隻雌鳥的子代數量，可以預期下一個生殖季每隻雌鳥的子代數量。結果顯示利用同種生殖成功的線索較利用同種密度線索更能有效的作預測，因為同種的密度不能直接反應出個體的生殖成功與繁殖地點的品質。Doligez *et al.* (2002)

研究亦指出白領姬鶉(*Ficedula albicollis*)繁殖地點的遷入與遷出和同種子代數量及品質有關，成鳥遷入率隨著子代數量少而降低，遷出率則隨著同種子代的數量少和品質的不好而增加，顯示成鳥會利用公眾訊息選擇適合繁殖的地點。公眾訊息對於沒有繁殖經驗的個體在繁殖地點選擇上亦提供直接的利益，Schjorring *et al.* (1999)實驗證實利用同種個體的生殖成功來評估繁殖地點品質的好壞，可以增加鸕鶿(*Phalacrocorax carbo sinensis*)第一次繁殖個體的生殖成功。

### **巢防衛(nest defense)**

巢防衛為親代照顧的形式之一，藉由巢防衛可以提高子代存活率進而增加親代的適存度(Clutton-Brock 1991)。親代的巢防衛行為普遍存在於脊椎動物(Clutton-Brock 1991)，主要功能是避免掠食者(Olendorf and Robinson 2000)、同種入侵者或寄生者(Briskie and Sealy 1989, Hobson and Sealy 1989, Neudorf and Sealy 1992)。雖然巢防衛可以增加子代的存活率(Forester 1979, Harris *et al.* 1995, Ng and Wilbur 1995, Petranka 1990)，但是對於執行巢防衛的親代而言同時也伴隨著一些代價，如：能量的消耗、被掠食或被傷害的風險增加、減少交配的機會以及覓食時間(Fitzpatrick 1973)，因此，親代投資理論(parental investment theory)預測繁殖親代應該會根據子代的狀況(如：窩卵數、

發育期數)或未來的價值進行評估而調整其投入巢防衛的程度 (Olendorf and Robinson 2000, Redmond *et al.* 2009, Tornick 2010)。

Tornick (2010)實驗結果顯示雌性的紅背蝾螈(*Plethodon cinereus*)對於發育期數較大的卵(產後六週)的防衛行為顯著多於發育期數較小的卵(產後四週)。Redmond *et al.* (2009)實驗結果亦顯示東美洲王霸鶉(*Tyrannus tyrannus*)的親鳥隨著幼鳥年紀的增長會提供更多的防衛，但是生殖季越後期親鳥投入的防衛便減少。Hom *et al.* (1990)也提出動態最適化模式(dynamic optimization model)，其結合撫育代價和獲益去預期親代個體執行巢防衛的適存度結果。結果顯示：當窩卵數增加且撫育者體型小時，進行巢防衛會減低親代個體的適存度，因而可以預期窩卵數大且體型小的物種，可能缺乏或有較少的巢防衛行為。

另外，掠食稀釋效應(predation dilution)和子代的可口性 (palatability)亦可解釋為何有些物種的親代缺乏巢防衛或具有棄巢的行為。雌性的東部半趾蝾螈(*Hemidactylium scutatum*)會將子代產於共同的巢(joint nest)，但最後只有一隻雌蝾螈會留下來進行撫育及防衛的工作(Harris and Gill 1980, Harris *et al.* 1995)。數個解釋共同巢的假說，如：棲地飽和、種內生殖寄生、侵略性的侵占和掠食稀釋效應等，Harris *et al.* (1995)實驗結果顯示雌蝾螈允許其他雌蝾螈於同一巢內進行產卵，可能因為稀釋效應而減少自己子代被掠食的風險。實驗過程中

作者也觀察到雌蟾只會撫育、防衛其自己的子代，更支持掠食稀釋效應的假說。許多蛙類和蠍蟾的卵或胚胎對於掠食者而言是具有毒性或難吃的(Crossland and Alford 1998, Gunzburger and Travis 2005, Hess and Harris 2000, Wassersug 1971)，因而可以減少被掠食的風險，使得親代可以不需要提供防衛，減少進行巢防衛需要付出的代價(Forester 1979, Harris *et al.* 1995, Hess and Harris 2000)。Hess and Harris (2000)以步行蟲作為掠食者進行東部半趾蟾(*H. scutatum*)和奧柯脊口蟾(*Desmognathus ocoee*)兩種蠍蟾卵的可口性測試，奧柯脊口蟾過去已被證實對於有些甲蟲而言是好吃的(Forester 1979)，實驗結果顯示步行蟲會刺破兩種蠍蟾的卵，但是只會吃奧柯脊口蟾的卵，證實東部半趾蟾的卵對於掠食者而言是具有毒性或難吃的，而可以減少被掠食的風險。

### **蛙類的多重交配**

由於雌蛙與雄蛙配子形成的親代投入(parental investment)有所不同，而影響蛙類的交配模式(Andersson 1994, Trivers 1972)。雌蛙卵子形成的過程中，需要消耗大量的能量資源去生成卵黃提供胚胎生長、發育所需的營養，因此，雌蛙的生殖成功受限於能量的獲得。反之，雄蛙精子形成的過程能量消耗相對較少，而雄蛙的生殖成功則取決於

一個生殖季的交配次數(Andersson 1994, Berven 1981, Trivers 1972)。因為爆發性生殖的雌蛙是同時性的進行交配，雄蛙獲得交配次數較少，一個生殖季少有交配超過三次的雄蛙，少於 5% 的雄性個體交配超過一次(Sullivan *et al.* 1995)。但是，多重交配(multiple mating)則普遍發生於生殖季長的物種，雄蛙可以在 3-6 個月的生殖季內交配超過 15 次(Dyson *et al.* 1998, Murphy 1994)。

成蛙的多重交配(一夫多妻或一妻多夫)會導致多重父子關係(multiple paternity)或多重母子關係(multiple maternity)。蛙類一夫多妻(polygyny)被定義為一隻雄蛙在不同的時間點與不同的雌蛙進行交配。蛙類的一夫多妻可分為三種不同類型：「爭奪競爭一夫多妻」(scramble competition polygyny)、「群體展示一夫多妻」(lek polygyny)和「資源防衛一夫多妻」(resource defence polygyny) (Sullivan *et al.* 1995)。爭奪競爭一夫多妻大多發生於爆發性生殖的物種，雄蛙短時間內會高密度的聚集於繁殖水池內鳴叫或於產卵地點附近主動搜尋雌蛙，通常雄蛙會較雌蛙先到達水池，且雄蛙的數量多於雌蛙，因而導致雄蛙之間有強烈的爭奪競爭(scramble competition) (Sullivan *et al.* 1995)。由於受生殖時間短的限制，爆發性生殖物種發生一夫多妻的機會不高(Emlen and Oring 1977)，美洲林蛙(*Rana sylvatica*)和大蟾蜍(*Bufo bufo*)約只有 1% 的雄蛙會與兩隻雌蛙進行交配(Davies and

Halliday 1979, Howard 1980)。群體展示一夫多妻即雄蛙聚集鳴叫使雌蛙可以選擇適合的配偶，此類物種一夫多妻發生的機會相對較高，Murphy (1992)實驗指出雄性咆雨蛙(*Hyla gratiosa*)的配偶數量可多達17隻。最後是資源防衛一夫多妻，雄蛙通常會獨占並防衛能增加雌蛙生殖成功的產卵地點，對於入侵領域的雄蛙具有攻擊的行為。雌蛙配偶的選擇常會根據雄蛙佔領之領域品質的好壞，當雄蛙擁有的領域品質較多且較好，雄蛙能獲得交配的機會則越多(Emlen 1968, 1976, Howard 1978a,b, Martof 1953, Ryan 1980, Well 1978)。

蛙類的一妻多夫(polyandry)分為兩類：同時性一妻多夫和連續性一妻多夫。同時性一妻多夫(simultaneous polyandry)被定義為兩隻或兩隻以上的雄蛙同時釋放精子於卵上或卵附近，每隻雄蛙的生殖成功取決於其精子競爭的成功(Parker 1990a, b)以及雌性的選擇(Simmons *et al.* 2009)。連續性一妻多夫(sequential polyandry)則被定義為雌蛙於一個生殖季與多隻雄蛙交配，由於交配事件是分開的，因此交配過程沒有精子競爭(Byrne and Keogh 2009)。一妻多夫的交配模式雌性個體可能可以獲得一些利益，如：增加受精成功、增加精子的品質和子代基因的多樣性(Jennions and Petrie 2000, Olsson *et al.* 1996, Vieites *et al.* 2004, Yasui 1998)。但是，過去研究針對近50%的交配事件為同時性一妻多夫的佐治亞索蟾(*Crinia georgiana*)進行假說的測試，發現一妻

多夫沒有提供雌蛙在基因上的利益，反而減少卵的受精成功率，雌蛙與1隻雄蛙交配時，卵的受精率高達96%，但是，雌蛙若同時與2-5隻的雄蛙交配時，卵的受精率則只有68-64%，而且增加雌蛙的死亡率 (Byrne and Roberts 1999, 2000)。一妻多夫除了可以獲得基因上的利益外，Byrne and Keogh (2009)實驗結果顯示棕澳擬蟾(*Pseudophryne bibronii*)雌蛙會連續與2-8隻雄蛙進行交配、產卵，由於雌蛙將卵分散於不同雄蛙的巢內，可避免在不可預期環境中的巢失敗而導致子代全數死亡，因而雌蛙連續性的一妻多夫顯著的增加子代的存活率。另外，雄蛙竊卵的行為(clutch piracy)也可能導致多重父子關係，Vieites *et al.* (2004)實驗發現沒有配對的雄性林蛙(*Rana temporaria*)會在交配對完成產卵離開卵團之後，前往抱住卵團並釋放精子，以增加卵團的受精率，此行為亦可能導致多重父子關係。

## 材料與方法

### 實驗樣區

實驗樣區位於台灣省南投縣鹿谷鄉溪頭的竹林內(23° 39' 20" N, 120° 48' 10" E)，竹林主要由孟宗竹(*Phyllostachys edulis*)和麻竹(*Sinocalamus latiflorus*)組成(Kam *et al.* 1996)。溪頭位於海拔高度約 1016 公尺的山區，年均溫 18°C，年雨量 3000 公釐，雨量主要集中在 2 月至 9 月。竹子會定期的砍伐，砍伐後的竹子形成中空的竹筒，在雨季會積水作為艾氏樹蛙的生殖場所(Kam *et al.* 1996)。

### 重複產卵樣本採集

野外採集時間是 2007 年至 2009 年的 3 月至 8 月，艾氏樹蛙生殖季的初期，在溪頭竹林內尋找並標記有卵或蝌蚪的竹筒，之後每週固定追蹤一次已標記的竹筒是否有重複產卵，若發現有蝌蚪、卵及護卵雄蛙的重複產卵竹筒，分別計算蝌蚪與卵的數量並將其帶回實驗室飼養。蝌蚪飼養至接近 Gosner 42 期(Gosner 1960)時，剪其部分尾巴並保存於 95%酒精以進行 DNA 萃取和基因型定型。卵孵化成蝌蚪後，同樣飼養至接近 Gosner 42 期(Gosner 1960)，剪其部分尾巴以進行 DNA 萃取和基因型定型。護卵雄蛙則以游標尺測量吻肛長(snout-vent length, SVL)(準確度 0.01mm)，並以電子秤測量其重量(準確度 0.01



克)。護卵雄蛙利用剪趾法(toe-clipping)進行個體標記，並將腳趾保存於 95%酒精，之後做組織 DNA 的萃取及基因型定型以鑑定親子關係。

### **雌蛙撫育行為的觀察**

重複產卵雌蛙撫育行為的觀察從 2009 年 6 月 27 日至 8 月 31 日，共 66 天。在野外發現有重複產卵的竹筒時，先將竹筒內的蝌蚪與卵全部採回實驗室飼養，再從其他竹筒換置大、小蝌蚪各 11 隻於重複產卵的竹筒中，之後在竹筒上方設置漏斗狀陷阱(Kam *et al.* 2000)(圖 1)，觀測回竹筒的雌蛙數量並判斷雌蛙是否有餵食蝌蚪的行為。每天於白天時間將陷阱中的蝌蚪收回，以電子秤測量 22 隻蝌蚪的總體重(準確度 0.001 克)，並以 Nikon D90 相機拍攝蝌蚪腹部，作為雌蛙是否有餵食行為的判定依據，被雌蛙餵食過的蝌蚪總體重會有明顯增加的趨勢，而且蝌蚪腹部會因為充滿卵粒而膨脹(圖 2)。蝌蚪體重測量前先放置一個裝有少許水的培養皿(直徑 90 mm)於電子秤上並歸零，再將同一窩蝌蚪個別拭乾放入培養皿中，測得同一窩蝌蚪的總體重。腹部拍攝的方式是將蝌蚪放置在培養皿中並蓋上蓋子，蓋子利用藍色紙作為背景色，由下往上的方式進行蝌蚪腹部的拍攝。陷阱中抓到雌蛙進行吻肛長及體重的測量，並剪其腳趾作個體的標記，再將腳趾保存於 95%酒精，以便日後做組織 DNA 的萃取及基因型定型。處理

完的雌蛙釋放回離竹筒約 1 公尺處的地面。在天黑前，將完成體重測量及腹部拍攝的蝌蚪放回原竹筒，繼續監測雌蛙撫育的行為。

## 重複產卵兩批子代親子關係分析

### 一、DNA 萃取及微衛星基因型定型

利用 Master Pure™ DNA Purification Kit(EPICENTRE)萃取蝌蚪尾巴和成蛙腳趾組織的 DNA，DNA 萃取前先將保存於 95%酒精的組織用二次水(distilled water)洗滌兩次，再根據產品的步驟進行 DNA 萃取，最後將乾燥的 DNA 產物溶於 60  $\mu$  的 1 x TE buffer(10mM tris, 1mM EDTA, pH 8.0)中並保存於-20°C 冰箱。

本研究利用 5 個微衛星基因座(microsatellite loci)分析親子關係，分別為 *CEd12365*、*CEd15688*(Chen *et al.* 2005)、*CEd19091*、*CEd19063*、*CEd 13854*(Chen *et al.* 2011)。每個微衛星基因座的前置或反置引子(forward or reverse primer)5'端有 HEX、FAM 或 TAMRA 螢光染劑標定。

利用聚合酶連鎖反應(Polymerase Chain Reaction, PCR)進行微衛星基因座片段的增幅。PCR 反應總體積為 5 $\mu$ l，包含 1  $\mu$ l DNA 樣本、0.25 units Go Taq® Flexi DNA polymeras(Promega)、2-2.5 mM MgCl<sub>2</sub>(Promega)、0.1-0.15 mM dNTP(Amersham, GE)、1.0  $\mu$ l 5X

Colorless Go Taq® Flexi Buffer(pH 8.5, Promega)、0.1 μM 前置和反置引子。利用 GeneAmp®9700 或 Biometra®T3000 PCR 機器進行 DNA 片段的增幅，PCR 熱循環流程為 95°C 5 分鐘的起始變性反應，接著重複以下步驟 45 個循環進行放大，95°C 30 秒，各組引子適合的黏合溫度 30 秒，72°C 30 秒，最終是 72°C 10 分鐘的延長反應。PCR 產物利用 MegaBACE 1000 自動定序儀(Amersham, GE)跑線性聚丙烯醯胺凝膠電泳(linear polyacrylamide gels, LPA)，並以 MegaBACE™ ET400-R Size Standard (Amersham, GE)作為 DNA 片段大小判定的依據。電泳結果利用 Genetic profiler 2.2 (Amersham, GE)軟體判讀微衛星對偶基因的片段大小。獲得所有個體的 5 個微衛星基因座的基因型後，利用 Cervus 3.0 軟體(Kalinowski *et al.* 2007)計算其個別的對偶基因數量、對偶基因長度範圍、排除機率(exclusion probability)和無效等位基因頻率(null allele frequency)。

## 二、親子關係的判定

本研究利用 COLONY 2.0 (Jones and Wang 2010)軟體分析重複產卵兩批子代與親代的親子關係。COLONY 2.0 是以概似法(likelihood method)為基礎，發展出推斷兩批子代的血緣關係(sibship)和親子關係(parentage relationship)的分析軟體(Jones and Wang 2010, Wang 2004)。

重複產卵兩批子代的親子關係分析過程中，並非兩批子代所有親代的基因型都能被獲得，而且兩批子代是否為兄弟姊妹的關係也不清楚，因此本研究欲利用 parental 和 sibship reconstruction 兩種方法進行親子關係的分析(Jones *et al.* 2010)。GERUD 2.0 和 PARENTAGE 1.0 是常用於 parental reconstruction 的分析軟體，COLONY 2.0 和 PEDIGREE 2.2 則常用於 sibship reconstruction 的分析軟體。其中，COLONY 2.0 是可以同時進行 parental 和 sibship reconstruction，並且能完善處理突變、定型錯誤和無效等位基因問題(Jones *et al.* 2010, Wang 2004)，故本研究最後選用 COLONY 2.0 作為親子關係分析的軟體。若欲分析的樣本中包含親代候選人的資料，COLONY 2.0 軟體會在 95%信賴度下將親代候選人與子代進行配對。若樣本沒有親代候選人的資料，COLONY 2.0 軟體會根據子代的基因型重建親代的基因型，進行親子關係的推斷(Jones and Wang 2010)。

COLONY 2.0 軟體的執行需要 5 個輸入檔，包括對偶基因頻率、基因型定型錯誤機率、雄蛙基因型、雌蛙基因型和子代基因型。本研究的執行參數設定如下：(1)候選雄蛙和雌蛙的交配系統設定為多偶制(polygamy)。 (2)程式執行的時間長度設定為適中(medium)。 (3)對偶基因頻率設定為不更新。對偶基因頻率是根據所有樣本的親代對偶基因和出現於子代但親代沒有的對偶基因計算而得。 (4)每個微衛

星基因座的對偶基因丟失的機率(allelic dropout rate)和基因型定型錯誤的機率皆設定為 0.05。 (5)親代候選人中可能為子代的父親和母親之或然率(probability of a father/mother)分別設定為 0.743 和 0.590。其計算方式是野外採集的所有雄蛙和雌蛙，經初步親子關係的推斷後，確定為子代的父親和母親的比例。若樣本有採集到交配的成蛙，則親代的或然率為 1。 (6)隨機數值(random number seeds)設定為 1234 和 6789。每窩重複產卵的樣本會設定一樣的參數，不一樣的隨機數值(1234 和 6789)進行 2 次親子關係分析並比較其結果是否一致。如果程式執行 2 次獲得的親子關係結果不一致時，程式執行的時間長度改為較長(long)後，再重新執行一次，以取得更為穩定的親子關係結果。

### **共同餵卵雌蛙的親緣關係**

利用 Coancestry 1.0 軟體(Wang 2011)分析 2009 年雌蛙撫育行為的觀察中，有兩隻或兩隻以上共同餵食蝌蚪之雌蛙的親緣關係(relatedness)。Coancestry 1.0 軟體可以執行 7 種成對個體的親緣關係(pairwise relatedness)的參數估計及 4 種近親交配係數(inbreeding coefficients)的參數估計，其中有 2 種參數估計(TrioML 和 DyadML)是以概似法為基礎，因而可允許近親交配和基因型定型錯誤。Coancestry 1.0 軟體的執行包括模擬數據(simulated dataset)和實際數據(empirical dataset)兩個部分。模擬數據執行的主要目的是要從 7 個

親緣關係參數估計方法中，選取模擬值與實際值(relatedness values)相關性最高的方法作為分析的依據。模擬數據的執行需要設定對偶基因型頻率、基因型缺失頻率、基因型定型錯誤頻率、預設可能的親緣關係數量等參數。對偶基因頻率是根據所有樣本的親代對偶基因和出現於子代但親代沒有的對偶基因計算而得。基因型缺失頻率是計算所有個體每個基因座沒有定型成功的比例。基因型定型錯誤頻率是選取每窩卵 15%的樣本數量，進行兩次基因型定型的過程，分別計算 5 個基因座兩次基因型定型結果不同的比例(Chen *et al.* 2011)並加總無效等位基因頻率。可能的親緣關係預設是根據 Coancestry 1.0 軟體使用手冊表 1 作設定，每種親緣關係(double first cousins 除外)皆預設有 100 對個體，參考個體數量(number of reference individuals)設定為 100，重新取樣數量(number of bootstrapping sample)設定為 100。軟體會根據上述設定值模擬可能的個體的基因型並進行分析。另外，實際數據的執行需要個體的基因型、對偶基因型頻率、基因型定型錯誤頻率等參數。個體基因型為共同餵食蝌蚪之 8 隻雌蛙，其他的參數設定則與上述模擬數據相同。

## 統計分析

利用 SAS 統計軟體進行卡方檢定(Chi-square test)檢測產第一批子代的雄蛙與雌蛙再利用同一竹筒進行生殖與否的比例是否為 1:1。

## 結果

### 重複產卵樣本採集

2007 至 2009 年共採集 64 窩重複產卵的樣本，各年間採集數量分別為 18、19 和 27 窩。共採集 84 隻雄蛙和 53 隻雌蛙，各年間採集的雄蛙數量分別為 11、25 和 48 隻，雌蛙數量則分別為 0、22 和 31 隻(表 1)。64 窩重複產卵的樣本中，第一批子代的數量介於 2-37 隻，平均為  $10.5 \pm 7.6$  隻，第二批子代的數量則介於 10-155 粒，平均為  $44.2 \pm 24.6$  粒。

### 重複產卵兩批子代親子關係分析

艾氏樹蛙重複產卵親子關係分析使用的 5 個微衛星基因座分別有 13-23 個對偶基因數目，排除機率介於 0.392-0.736，整體的排除機率在一個親代已知的情況下為 0.986，顯示利用這 5 個微衛星基因座作為遺傳標記分析重複產卵兩批子代的親子關係是具有可信度。基因座的無效等位基因頻率介於 0.0232-0.0964，其中 *CEd15688* 和 *CEd13854* 有較高的無效等位基因頻率。5 個微衛星基因座基因型定型錯誤的機率則介於 0-0.0260(表 2) (Chen *et al.* 2011)。

64 窩重複產卵的樣本中，選定 24 窩至少有 1 隻成蛙(護卵雄蛙或餵卵雌蛙)及兩批子代數量皆大於 10 隻的樣本進行親子關係的分析，



並且 5 個微衛星基因座皆完成基因型定型才進行親子關係的配對。其中，2008 和 2009 年分別有 1 個(竹筒 J31)和 3 個(竹筒 Y133、Y39、A02)樣本子代數量不足 10 隻，選定做親子關係分析的原因是竹筒 J31 在採樣的過程中有觀察到雌蛙餵食的行為，其餘 3 個樣本在觀測雌蛙撫育行為的實驗中，皆有雌蛙回竹筒餵食蝌蚪的紀錄，因此納入親子關係分析的樣本。總共分析 39 隻雄蛙和 30 隻雌蛙(表 1)，第一批子代數量 333 隻，第二批子代數量 500 隻(表 3)。

利用 COLONY 2.0 軟體進行重複產卵兩批子代的親子關係配對，結果顯示 23 窩(註 1)重複產卵的親子關係出現 8 種不同的組合，分別為異父異母、異父同母、異父部分同母、同父異母、部分同父異母、同父母、同父部分同母、部分同父母(表 4)。總括 23 窩重複產卵樣本，異父異母和部分同父異母的親代組合窩數最多(n=7，表 4)。兩批子代的親子關係有 21.7% 是同父、34.8% 是部分同父、43.5% 是異父，13.0% 是同母、13.0% 是部分同母、73.9% 是異母。我進一步的探討參與產第一批子代的成蛙再利用同一竹筒進行生殖與否的情況，結果顯示參與產第一批子代的雄蛙會與不會再利用竹筒比例分別為 13:10，兩者比例沒有顯著的差異(Chi-square test,  $X^2=0.3913$ ,  $p=0.5316$ )(圖 3)。產第一批子代的雌蛙會與不會再利用竹筒比例分別為 6:17，兩者比例具有顯著的差異(Chi-square test,  $X^2=5.2609$ ,  $p=0.0218$ )(圖 4)。

註 1：本研究於野外採集的 64 窩重複產卵樣本中，選取 24 窩進行親子關係的分析，由於竹筒 Y95 在 COLONY 軟體分析中無法獲得一致性的結果(見 COLONY 有問題的分析結果)，因此，最後只取其餘 23 窩的分析結果作討論。

### **COLONY 有問題的分析結果**

利用 COLONY 2.0 進行重複產卵兩批子代親子關係配對的過程中，每一窩親代和子代的基因型都會設定同樣的參數，不一樣的隨機數值 1234 和 6789 分析 2 次，比較兩次分析結果和最大概似值是否一致。分析 24 窩的樣本中，其中的 19 窩在 2 次的親子關係分析結果和最大概似值都呈現一致。有 5 窩的樣本一致性較低，分別為竹筒 I20、I43、J31、Y98 和 Y95。竹筒 I20 在 I20-1234-M 與 I20-6789-M 的 2 次分析結果呈現不一致，另外設定 I20-1234-L 和 I20-6789-L(註 2)再進行親子關係配對，結果顯示程式執行時間設定為長的 2 次分析結果 I20-1234-L、I20-6789-L 和 I20-1234-M 呈現一致，最後取 I20-1234-M 的分析結果。竹筒 I43 在 I43-1234-M 與 I43-6789-M 的 2 次分析結果呈現不一致，另外設定 I43-1234-L 和 I43-6789-L 進行分析，結果顯示 I43-1234-L 與 I43-1234-M、I43-6789-M 結果呈現不一致，但是 I43-6789-L 和 I43-6789-M 分析結果呈現一致，最後取 I43-6789-M 的

結果。在竹筒 J31 方面，由於 J31-6789-M 的設定軟體執行不完全，另外設定 J31-1234-L 和 J31-6789-L 再進行分析，結果顯示 J31-1234-L 和 J31-1234-M 呈現一致，最後取 J31-1234-M 的分析結果。在竹筒 Y98 方面，Y98-1234-M 和 Y98-6789-M 軟體執行不完全，另外設定 Y98-1234-L 和 Y98-6789-L 再進行分析，Y98-6789-L 軟體一樣執行不完全，最後再設定 Y98-5-M 進行分析，結果顯示 Y98-1234-L 和 Y98-5-M 呈現一致，因此取 Y98-1234-L 的結果。在竹筒 Y95 方面，Y95-1234-M 和 Y95-6789-M 結果不一致，另外設定 Y95-1234-L 和 Y95-6789-L 再進行分析，結果顯示 Y95-1234-M、Y95-6789-M、Y95-1234-L 和 Y95-6789-L 都呈現不一致，因此，竹筒 Y95 不列入親子關係分析的結果與討論中。

親子關係分析結果判定竹筒 Y50 兩批子代為同父異母所產，其第一批子代的親代組合為 m2440xf2(18)(註 3)和 m2440xf1(1)，第二批子代的親代組合則為 m2440xf1(13)。經過評估後將第一批子代 m2440xf1(1)之個體歸為第二批子代，理由是竹筒 Y50 樣本採集的蝌蚪數為 19，但蝌蚪分析數量為 20，實驗過程可能因人為疏失將第二批子代混到第一批子代，因此，最後判定竹筒 Y50 兩批子代的親子關係為同父異母(見附錄)。

註 2：I20-1234-M 表示竹筒 I20、隨機數值設定為 1234、程式執行時間設定為適中(medium)。I20-1234-L 表示竹筒 I20、隨機數值設定為 1234、程式執行時間設定為長(long)。

註 3：m2440xf2(18)表示雄蛙編號 m2440 和雌蛙編號 2 交配，其子代數量有 18 個。

### **雌蛙撫育行為的觀察**

2009 年共紀錄到 14 窩重複產卵竹筒有雌蛙回竹筒餵食，共 33 次餵食事件，包括 9 次蝌蚪有被餵食但陷阱沒有補捉到雌蛙。重複產卵竹筒的餵食雌蛙數量為 1-3 隻，只有 1 隻雌蛙餵食蝌蚪的窩數為 12，而由 2 隻和 3 隻雌蛙餵食蝌蚪的窩數都為 1。所有雌蛙回竹筒餵食的次數介於 1-4 次，平均為 1.6 次。33 次的餵食事件中，蝌蚪平均體重增加百分比介於 3.2%至 51.7%，平均為  $19.2 \pm 12.2\%$ 。

我採集 14 窩有雌蛙回竹筒餵食的樣本，選取其中 8 窩進行兩批子代的親子關係分析，結果顯示兩批子代的母子關係為同母、異母和部分同母的窩數分別為 1、4、3 窩。竹筒 Y98 的兩批子代為同母，在監測期間捕捉到同一隻雌蛙餵食兩次。在 4 窩為異母所產的子代中，有 3 窩(竹筒 A01、Z22 和 Y42)是由第一批子代的媽媽餵食，但其中竹筒 A01 還有另一隻非親代的雌蛙餵食。另一窩竹筒 A02 則由

第二批子代的媽媽餵食(表 5)。在 3 窩為部分同母所產子代中(竹筒 Y146、Y133 和 Y39)，竹筒 Y146 第一批子代與第二批子代的媽媽皆有餵食，另外還有一隻非親代的餵食雌蛙。竹筒 Y133 由第二批子代的媽媽餵食。竹筒 Y39 餵食雌蛙是第一批部分子代和第二批子代的親代(表 5)。另外，竹筒 X01 在非觀測期間有追蹤到 3 隻雌蛙回竹筒餵食，其中包含一隻非親代的雌蛙，在 5 月 17 日這天和第二批子代的媽媽同時被捕獲，無法判定蝌蚪由哪一隻雌蛙餵食，但我推測由第二批子代的媽媽餵食的可能性較大(表 5)。

### **共同餵卵雌蛙的親緣關係**

Coancestry 1.0 軟體模擬結果顯示，7 個參數值中以 DyadML (dyadic likelihood estimator)(Milligan 2003)的模擬 R 值與實際值相關性最高，因此，本研究最後選取以 DyadML 方法所得的數據作為結果及討論的依據。雌蛙撫育行為的觀察發現竹筒 A01、Y146、X01 分別有 2、3、3 隻雌蛙共同餵食蝌蚪，利用 Coancestry 1.0 軟體分別計算竹筒內成對 R 值，共獲得 7 組成對的 R 值，這 7 組 R 值介於 0-0.2147(表 6)。對照 Coancestry 1.0 軟體中定義各種親緣關係的理論 R 值(表 7)，竹筒 A01、Y146、X01 共同餵食蝌蚪之雌蛙的親緣關係介於無親緣關係至堂或表兄弟姊妹的關係。

## 討論

### 艾氏樹蛙重複產卵的類型

過去研究指出艾氏樹蛙重複產卵有兩種不同的形式：(1)生長期數相近的兩批卵重疊(鄭偉群，未發表資料)，(2)第一批卵孵化成蝌蚪後，另一批卵與其重疊，形成兩批不同時期的子代(卵與蝌蚪)共存於同一個竹筒中(Lin *et al.* 2008, 本研究)。不同重複產卵形式具有不同的生殖策略，第一種重複產卵形式發生於雄蛙在護卵的過程中(Chen *et al.* 2007)，護卵雄蛙繼續鳴叫吸引雌蛙前往與其交配，因而產下第二批卵，形成兩批期數稍微不同的卵共存於同一竹筒(鄭偉群，未發表資料)。利用微衛星 DNA 標記分析，證實重複產的兩批卵大部分是護卵雄蛙與不同的雌蛙交配所產，即連續性一夫多妻(sequential polygyny)(鄭偉群，未發表資料)。雄蛙於護卵期間繼續鳴叫吸引雌蛙的現象，推測可能是雄蛙補償護卵期間喪失的生殖機會所致(鄭偉群，未發表資料)。

第二種重複產卵形式發生於生殖季中、後，因為適合生殖的資源(即竹筒)有限，而導致雄蛙選擇已有蝌蚪佔據的竹筒進行生殖，產生兩批不同時期的子代(卵與蝌蚪)共存於同一個竹筒，約有 40% 已有蝌蚪佔據的竹筒在同一生殖季內會被重複利用(Lin *et al.* 2008)。第二批子代孵化後會與第一批子代共存約 4 個星期(Kam *et al.* 1997)，第一批

子代因體型大在食物競爭上具有優勢，而導致第二批較晚孵化的子代生長緩慢且需要較長的時間才能達變態(Chen *et al.* 2001, Kam *et al.* 1997)，也有可能因為無法競爭而長期飢餓導致無法變態而死亡(Kam *et al.* 1997)。Lin *et al.* (2008)研究顯示被重複利用竹筒的平均蝌蚪數量為  $10.5 \pm 13.1$  隻，顯著少於未被重複利用竹筒的平均蝌蚪數量  $22.9 \pm 19.0$  隻，本研究的調查結果與 Lin *et al.* (2008)結果相符，顯示成蛙會偏好重複利用蝌蚪數量較少的竹筒進行再生殖，避免兩批子代因競爭而降低存活率(圖 5) (Lin *et al.* 2008, 本研究)。其他利用同種線索選擇產卵地點的物種，在掠食、競爭和生殖品質的權衡(trade-off)下，產卵地點的選擇亦有不同的偏好與限制，如：日本林蛙(*R. japonica*)成蛙只選擇同種卵期數小於 Gosner 16 期的產卵地點進行生殖(Iwai *et al.* 2007)。 *P. borellii* 成蛙會避免選擇有大蝌蚪或中蝌蚪存在的產卵地點，但會選擇有小蝌蚪存在的地點產卵(Halloy 2006)。

### 重複產卵兩批子代的親子關係

重複產卵兩批子代親子關係有 8 種組合，由於成蛙交配的模式導致兩批子代具有部分同父和部分同母的關係，此種結果比起同父同母或異父異母更為複雜。同父同母即兩次的生殖事件皆由同一對交配成蛙所產；反之，異父異母即為兩次生殖事件由不同對的交配成蛙所

產。兩批子代父子關係為部分同父，可能因為同一隻雄蛙參與兩次的交配事件，其中一次的交配事件發生同時性一妻多夫(如：竹筒 G39)或連續性多重交配(如：竹筒 A01)。艾氏樹蛙的同時性一妻多夫係指兩隻或多隻雄蛙與一隻雌蛙進行交配導致多重父子關係(Chen *et al.* 2011, 本研究)，其造成的原因可能是族群中雌蛙特別的偏好、雄蛙在生殖資源有限情形下的競爭或雌雄性比偏向雄性(Chen *et al.* 2011)。連續性多重交配(sequential multi-mating event)係指不同的交配對在短時間內，如：一個夜晚或一個星期內於同一竹筒進行生殖，形成相似發育期的子代重疊在一起。早期野外觀察發現艾氏樹蛙雄蛙在一個晚上有交配兩次的記錄，而且兩次的交配都成功的產下一批卵(莊國碩 1988)。另外，兩批子代母子關係為部分同母，可能因為同一隻雌蛙參與兩次的生殖事件，其中一次的生殖事件發生連續性一夫多妻(如：竹筒 Y39)或多重交配事件(如：竹筒 Y146)。連續性一夫多妻為一隻雄蛙在不同的時間點與不同的雌蛙進行交配而導致兩批子代有多重母子關係。

### **導致親子關係組合多的可能原因**

利用微衛星 DNA 標記分析結果顯示：重複產卵兩批子代的親子關係有 8 種組合，導致親子關係組合多的原因有很多，如：缺乏配偶



防衛、缺乏巢防衛、生殖資源有限和雌雄性比不等都可能導致親子關係組合多(Beecher and Beecher 1979, Byrne and Roberts 2004, Ewen *et al.* 2004, Møller 1990)。Rowe and Weatherhead (2007)研究發現雌性的旅鶇(*Turdus migratorius*)偶外交配(extra-pair mating)的機會增加可能與雄鳥缺乏領域性有關，雄鳥沒有領域性使得其他個體的移動範圍更大，促使偶外交配機會變大。Macdougall-Shackleton *et al.* (1996)研究也發現短暫的移除配對的雄性東部藍鶇(*Sialia sialis*)也會增加偶外的父子關係(extra-pair paternity)。因為鳥類通常藉由配偶防衛(Beecher and Beecher 1979)或繁殖領域的防衛(Ewen *et al.* 2004, Møller 1990)等方式來確保其子代的父子關係，降低撫育配偶偶外交配所產的子代之可能性。

生殖季初期，艾氏樹蛙雄蛙會占據適合生殖的竹筒鳴叫並吸引雌蛙，抱接後，配對成蛙將卵產於竹筒內壁的水面上，只有雄蛙會留於竹筒內進行護卵工作直到卵孵化(Chen *et al.* 2007)，野外觀察發現雄蛙看護卵的頻率相對不高，約佔卵期 30%的時間(Chen *et al.* 2007, Cheng and Kam 2010)。待卵孵化成蝌蚪後，雄蛙則離開竹筒，對該竹筒沒有再進行防衛的工作。卵孵化成蝌蚪後，雌蛙每隔 7-8 天會回到原竹筒餵食蝌蚪直到蝌蚪變態(Kam *et al.* 1998, 2000)，雌蛙結束餵食後便離開竹筒，對其他入侵竹筒的成蛙或掠食者並不會有防衛、攻擊

的行為(Kam *et al.* 2000)。因此，在資源有限的情況下，成蛙缺乏巢防衛使得其他個體可以輕易地重複使用竹筒，很可能是造成親子關係組合多的原因之一。另外，根據 Hom *et al.* (1990)提出動態最適化模式，推測成蛙的體型小且窩卵數大可能是親代缺乏巢防衛的原因之一。2007 至 2009 年野外採集 84 隻雄蛙和 53 隻雌蛙的吻肛長平均分別為  $3.15\pm 0.21$  和  $3.39\pm 0.33$  公分，屬於小型的蛙類，窩卵數平均為  $44.25\pm 24.63$ ，卵數多可高達 155 顆，因此，成蛙進行巢防衛可能會減低其個體的適存度。

#### 艾氏樹蛙重複產卵隱含的生殖策略

產第一批子代的雄蛙再利用竹筒與否的比例沒有顯著的差異，雄蛙選擇在同一竹筒內進行下一次生殖的機率約為 50%，**此結果拒絕原先認為重複產卵兩批子代應為異父所產的假設**。影響雄蛙重複利用同一竹筒進行生殖與否，推測可能與雄蛙的生殖策略有關。結合 Lin *et al.* (2008)野外標放結果，我推測雄蛙可能具有一個固定的活動範圍(home range)(莊國碩 1988)，離開原先產卵的竹筒後先到另一個竹筒進行生殖，這樣可以避免兩批發育期數相近的子代互相競爭。過一段時間後，等到第一批子代數量所剩無幾時，雄蛙會再回來重複利用該竹筒進行生殖，使得兩批子代的父子關係有同父的狀況。Lin *et al.* (2008)

野外標放沒有找到同一隻雄蛙重複利用相同的竹筒也說明野外工作無法全天候進行時，很容易產生片面的結果。總的來說，好的竹筒是有限的生殖資源(Lin and Kam 2008)，雄蛙會重複利用竹筒，除了可以確保產卵地點的品質外，並能減少尋找新巢需要耗費的能量和時間。兩批子代為異父所產的生殖策略可能如下：雄蛙在面臨產卵地點的選擇時，其可以選擇沒有蝌蚪占據的竹筒，也可以選擇有蝌蚪占據的竹筒。若選擇沒有蝌蚪占據的竹筒進行生殖，雖然可以避免兩批子代互相競爭，但是可能會面臨竹筒積水能力差導致竹筒品質不穩定的風險(Lin and Kam 2008)。相反的，雄蛙若選擇利用有蝌蚪占據的竹筒進行生殖，其會面臨兩批子代的競爭，但是有蝌蚪占據的竹筒其積水能力相對的可能較為持久，因而可以減少子代的死亡率。雄蛙後者的選擇策略導致了兩批子代為異父所產的狀況。

產第一批子代的雌蛙再利用竹筒與否的比例有顯著的差異，雌蛙選擇不再重複利用竹筒進行生殖的比例為 73.9%，**此結果拒絕原先認為重複產卵兩批子代應為同母所產的假設**，推測可能與雌蛙餵食的時和生理的限制有關。當雄蛙重複利用已有蝌蚪占據的竹筒進行鳴叫吸引雌蛙時，雄蛙可能吸引回竹筒餵食蝌蚪的雌蛙，也可能吸引到其他的雌蛙。由於餵卵雌蛙每隔 7-8 天才回竹筒餵食蝌蚪一次(Kam *et al.* 2000)，這可能可以解釋為何重複產卵兩批子代母子關係為同母比例較

預期低的原因(26%)。另外，由於雌蛙餵食蝌蚪的時間維持約 1-2 個月，餵卵的工作對雌蛙而言是非常耗能且卵的產生具有生理的限制，因而使得雌蛙重複利用竹筒的比例相對的較少。總的來說，好品質的竹筒是有限的，因此重複利用同一個竹筒進行生殖可以確保產卵地點的品質並減少尋覓新巢之時間與能量的耗費。再者，當兩批子代為同母所產時，也可能是雌蛙重複產卵的生殖策略(Burley 1980, Travis *et al.* 1987)。重複產卵可以縮短兩批子代的間隔時間，增加雌蛙一個生殖季的生殖機會(Westmoreland *et al.* 1986)。雌蛙於不同的時間點進行產卵，面臨不可預測的環境時，可以減少子代的死亡率，同時，雌蛙分散其撫育行為可以提高其個體的存活率與適存度(Burley 1980, Travis *et al.* 1987)。相反的，兩批子代為異母所產時，表示雌蛙產卵在已有蝌蚪的竹筒。生殖季中、後期，許多品質好的竹筒已被利用(Lin *et al.* 2008)，雌蛙選擇產卵在有蝌蚪竹筒，雖然可以確保產卵地點的品質，但必須面臨兩批沒有血緣關係的蝌蚪互相競爭。再者，當兩批子代為異母所產時，可能形成雌蛙共同生殖(如果兩隻雌蛙共同餵食)或寄生生殖(如果只有一隻雌蛙餵食)的現象(König 1997, Lyon and Eadie 2008)。

## 重複產卵的雌蛙撫育行為

艾氏樹蛙重複產卵的兩批子代母子關係多為異母，其延伸出複雜的雌蛙撫育行為。結合野外雌蛙撫育行為的觀察及親子關係分析結果顯示：重複產卵的重疊子代有同時由兩批子代的雌蛙進行餵食工作，也有只由產第一批子代或產第二批子代的雌蛙進行餵食工作。若第一批子代數量較少時，多由產第二批子代的雌蛙進行餵食(竹筒 A02、Y133 和 Y39)，反之，若第一批子代數量較多時，則由產第一批子代的雌蛙進行餵食(竹筒 Z22 和 Y42)。另外，親子關係分析結果也發現有非親代的雌蛙進行餵食工作。此結果顯示艾氏樹蛙重複產卵可能有類似鳥類或哺乳類的合作生殖(Canestrari *et al.* 2009, König 1997)或寄生生殖(Lyon and Eadie 2008, Soler and Soler 2000)的策略，兩種生殖策略的判定需視有多少隻雌蛙投入撫育工作以及每隻雌蛙付出的撫育努力量而定。

本研究對重複產卵兩批子代的雌蛙撫育行為只是初步的觀察，未來進行雌蛙撫育行為的觀察需要更嚴謹的實驗設計，進一步的探討艾氏樹蛙重複產卵是否有合作生殖或寄生生殖的策略，以及是否有無親緣關係或親緣關係度低的協助照顧者。以解決兩棲類生殖策略、親代照顧、親子關係等生態和演化上的問題。

## 總結

1. 艾氏樹蛙成蛙偏好利用蝌蚪數量少的竹筒進行重複產卵，可能為了確保竹筒品質並減少重疊兩批子代互相競爭的結果。
2. 艾氏樹蛙重複產卵兩批子代的親子關係有 8 種組合，以異父異母和部分同父異母的窩數最多( $n=7$ )，導致親子關係有多種組合的原因可能與親代缺乏巢防衛有關。
3. 重複產卵中，參與產第一批子代的雄蛙再利用竹筒與否的比例各佔約 50%，但大部分產第一批子代的雌蛙都不會再利用竹筒 (73.9%)。成蛙再利用竹筒比例的不同，可能是成蛙在面臨好的生殖資源有限及蝌蚪競爭權衡下，成蛙產卵地點的選擇策略。此外，雌蛙餵食的間隔時間與生理限制可能是導致兩批子代為同母比例較低的原因。
4. 重複產卵雌蛙撫育行為觀察發現兩批子代多由 1 隻雌蛙進行餵卵工作，2 隻或 2 隻以上雌蛙共同餵食的情況較少，根據親子關係分析結果顯示艾氏樹蛙重複產卵可能同時隱含著合作生殖與寄生生殖的策略。
5. 共同餵卵雌蛙的親緣關係介於無親緣關係至堂或表兄弟姊妹的關係，並可能存在無親緣關係或親緣關係度不高的協助照顧者。

## 參考文獻

- Andersson, M. 1994. Sexual selection. Princeton, NJ: Princeton University Press.
- Barbraud, C., J. C. Barbraud, and M. Barbraud. 1999. Population dynamics of the white stork *Ciconia ciconia* in western France. *Ibis* **141**: 469-479.
- Beecher, M. D., and I. M. Beecher. 1979. Sociobiology of bank swallows: reproductive strategy of the male. *Science* **205**: 1282-1285.
- Bergin, T. M. 1997. Nest reuse by Western Kingbird. *Wilson Bulletin* **109**: 735-737.
- Berven, K. A. 1981. Mate choice in the wood frog, *Rana sylvatica*. *Evolution* **35**: 707-722.
- Briskie, J. V., and S. G. Sealy. 1989. Changes in nest defence against a brood parasite over the breeding cycle. *Ethology* **82**: 61-67.
- Burley, N. 1980. Clutch overlap and clutch size: alternative and complementary tactics. *American Naturalist* **115**: 223-246.
- Byrne, P. G., and J. D. Roberts. 1999. Simultaneous mating with multiple males reduces fertilisation success in the myobatrachid frog *Crinia georgiana*. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences* **266**: 717-721.
- Byrne, P. G., and J. D. Roberts. 2000. Does multiple paternity improve fitness of the frog *Crinia georgiana*? *Evolution* **54**: 968-973.
- Byrne, P. G., and J. D. Roberts. 2004. Intrasexual selection and group spawning in quacking frogs (*Crinia georgiana*). *Behavioral Ecology* **15**: 872-882.
- Byrne, P. G., and J. S. Keogh. 2009. Extreme sequential polyandry insures against nest failure in a frog. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences* **276**: 115-120.
- Canestrari, D., J. M. Marcos, and V. Baglione. 2009. Cooperative breeding in carrion crows reduces the rate of brood parasitism by great spotted cuckoos. *Animal Behaviour* **77**: 1337-1344.

- Cavitt, J. F., A. T. Pearse, and T. A. Miller. 1999. Brown Thrasher nest reuse: a time saving resource, protection from search-strategy predators, or cues for nest-site selection? *Condor* **101**: 859-862.
- Cheng, W. C., and Y. C. Kam. 2010. Paternal care and egg survivorship in a low nest-attendance rhacophorid frog. *Zoological Studies* **49**: 304-310.
- Chen, Y. H., H. T. Yu, and Y. C. Kam. 2007. The ecology of egg attendance in an arboreal breeding frog, *Chirixalus eiffingeri* (Anura: Rhacophoridae), from Taiwan. *Zoological Science* **24**: 234-440.
- Chen, Y. H., W. C. Cheng, H. T. Yu, and Y. C. Kam. 2011. Genetic relationship between guardian adults and offspring and its response to paternal share in a rhacophorid frog. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, accepted.
- Chen, Y. H., Y. C. Kam, and H. T. Yu. 2005. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci for parentage analysis in a rhacophorid tree frog (*Chirixalus eiffingeri*) with unusual parental care. *Molecular Ecology Notes* **5**: 430-432.
- Chen, Y. H., Y. J. Su, Y. S. Lin, and Y. C. Kam. 2001. Inter- and intraclutch competition among oophagous tadpoles of the Taiwanese tree frog, *Chirixalus eiffingeri* (Anura Rhacophoridae). *Herpetologica* **57**: 438-448.
- Clutton-Brock, T. H. 1991. The evolution of parental care. Princeton, New Jersey, USA: Princeton University Press.
- Crossland, M. R., and R. A. Alford. 1998. Evaluation of the toxicity of eggs, hatchlings and tadpoles of the introduced toad *Bufo marinus* (Anura: Bufonidae) to native Australian aquatic predators. *Austral Ecology* **23**: 129-137.
- Davies, N. B., and T. R. Halliday. 1979. Competitive mate searching in male common toads, *Bufo bufo*. *Animal Behaviour* **27**: 1253-1267.
- Dillon, M. E., and J. Fiano. 2000. Oviposition site selection by the Tu'ngara Frog (*Physalaemus pustulosus*). *Copeia* **2000**: 883-885.



- Doligez, B., C. Cadet, E. Danchin, and T. Boulinier. 2003. When to use public information for breeding habitat selection? The role of environmental predictability and density dependence. *Animal Behaviour* **66**: 973-988.
- Doligez, B., E. Danchin, and J. Clobert. 2002. Public information and breeding habitat selection in a wild bird population. *Science* **297**: 1168-1170.
- Dyson, M. L., S. P. Henzi, T. R. Halliday, and L. Barrett. 1998. Success breeds success in mating male reed frogs (*Hyperolius marmoratus*). *Proceedings of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences* **265**: 1417-1421.
- Edgerly, J. S., M. McFarland, P. Morgan, and T. Livdahl. 1998. A seasonal shift in egg laying behaviour in response to cues of future competition in a treehole mosquito. *Journal of Animal Ecology* **67**: 805-818.
- Emlen, S. T. 1968. Territoriality in the green frog, *Rana clamitans*. *Copeia* **1968**: 240-243.
- Emlen, S. T. 1976. Lek organization and mating strategies in the bullfrog. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **1**: 283-313.
- Emlen, S. T., and L. W. Oring. 1977. Ecology, sexual selection, and the evolution of mating systems. *Science* **197**: 215-223.
- Erckmann, W. J., L. D. Beletsky, G. H. Orians, T. Johnsen, S. Sharbaugh, and C. D'antonio. 1990. Old nests as cues for nest-site selection: an experimental test with red-winged blackbirds. *Condor* **92**: 113-117.
- Ewen, J. G., D. P. Armstrong, B. Ebert, and L. H. Hansen. 2004. Extra-pair copulation and paternity defense in the hihi (or stitchbird) *Notiomystis cincta*. *New Zealand Journal of Ecology* **28**: 233-240.
- Fitzpatrick, L. C. 1973. Energy allocation in the Allegheny mountain salamander, *Desmognathus ochrophaeus*. *Ecological Monographs* **43**: 43-48.
- Forester, D. C. 1979. The adaptiveness of parental care in *Desmognathus ochrophaeus* (Urodela: Plethodontidae). *Copeia* **1979**: 332-341.

- Gergely, Z., L. A. Mészáros, J. Szabad, and T. Székely. 2009. Old nests are cues for suitable breeding sites in the Eurasian penduline tit *Remiz pendulinus*. *Journal of Avian Biology* **40**: 2-6.
- Gosner, K. L. 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica* **16**: 183-190.
- Gunzburger, M. S., and J. Travis. 2005. Critical literature review of the evidence for unpalatability of amphibian eggs and larvae. *Journal of Herpetology* **39**: 547-571.
- Halloy, M. 2006. Choice of oviposition site in *Pleurodema borellii* (Leptodactylidae): importance of conspecific tadpole size. *South American Journal of Herpetology* **1**: 72-78.
- Harris, R. N., and D. E. Gill. 1980. Communal nesting, brooding behaviour, and embryonic survival in the four-toed salamander *Hemidactylium scutatum*. *Herpetologica* **36**: 141-144.
- Harris, R. N., W. W. Hames, I. T. Knight, C. A. Carreno, and T. J. Vess. 1995. An experimental analysis of joint nesting in the salamander *Hemidactylium scutatum* (Caudata: Plethodontidae): the effect of population density. *Animal Behaviour* **50**: 1309-1316.
- Hess, Z. J., and R. N. Harris. 2000. Eggs of *Hemidactylium scutatum* (Caudata: Plethodontidae) are unpalatable to insect predators. *Copeia* **2000**: 597-600.
- Hobson, K. A., and S. G. Sealy. 1989. Responses of yellow warblers to the threat of Cowbird parasitism. *Animal Behaviour* **38**: 510-519.
- Hom, C. L., N. H. Willits, and C. W. Clark. 1990. Fitness consequences of nest defense in plethodontid salamanders: predictions of a dynamic optimization model. *Herpetologica* **46**: 304-19.
- Hoover, J. P. 2003. Decision rules for site fidelity in a migratory bird, the prothonotary warbler. *Ecology* **84**: 416-430.
- Howard, R. D. 1978a. The evolution of mating strategies in bull-frogs, *Rana catesbeiana*. *Evolution* **32**: 850-871.
- Howard, R. D. 1978b. The influence of male-defended oviposition sites on early embryo mortality in bullfrogs. *Ecology* **59**: 789-798.

- Howard, R. D. 1980. Mating behavior and mating success in wood frogs, *Rana sylvatica*. *Animal Behaviour* **28**: 705-716.
- Iwai, N., T. Kagaya, and I. Okochi. 2007. Choice of oviposition site by *Rana japonica*: role of the developmental stage of conspecific eggs. *Herpetologica* **63**: 31-34.
- Jennions, M. J., and M. Petrie. 2000. Why do females mate multiply? A review of the genetic benefits. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* **75**: 21-64.
- Jones, A. G., C. M. Small, K. A. Paczolt, and N. L. Ratterman. 2010. A practical guide to methods of parentage analysis. *Molecular Ecology Resources* **10**: 6-30.
- Jones, O. R., and J. Wang. 2010. COLONY: a program for parentage and sibship inference from multilocus genotype data. *Molecular Ecology Resources* **10**: 551-555.
- Kalinowski, S. T., M. L. Taper, and T. C. Marshall. 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology* **16**: 1099-1106.
- Kam, Y. C., C. F. Yen, and C. L. Hsu. 1998. Water balance, growth, development, and survival of arboreal frog eggs (*Chirixalus eiffingeri*, Rhacophoridae): importance of egg distribution in bamboo stumps. *Physiological Zoology* **71**: 534-540.
- Kam, Y. C., Y. H. Chen, T. C. Chen, and I. R. Tsai. 2000. Maternal brood care of an arboreal breeder, *Chirixalus eiffingeri* (Anura: Rhacophoridae) from Taiwan. *Behaviour* **137**: 137-151.
- Kam, Y. C., Y. H. Chen, Z. S. Chuang, and T. S. Huang. 1997. Growth and development of oophagous tadpoles in relation to brood care of an arboreal breeder, *Chirixalus eiffingeri* (Rhacophoridae). *Zoological Studies* **36**: 186-193.
- Kam, Y. C., Z. S. Chuang, and C. F. Yen. 1996. Reproduction, oviposition-site selection, and tadpole oophagy of an arboreal nester, *Chirixalus eiffingeri* (Rhacophoridae), from Taiwan. *Journal of Herpetology* **30**: 52-59.

- Knapp, R. A. 1993. The influence of egg survivorship on the subsequent nest fidelity of female bicolour damselfish, *Stegastes partitus*. *Animal Behaviour* **46**: 111-121.
- König, B. 1997. Cooperative care of young in mammals. *Naturwissenschaften* **84**: 95-104.
- Kuramoto, M. 1973. The amphibians of Iriomote of the Ryukyu Islands: ecological and zoogeographical notes. *Bulletin of Fukuoka University of Education* **22**: 139-151.
- Lin, Y. S., and Y. C. Kam. 2008. Nest choice and breeding phenology of an arboreal-breeding frog, *Kurixalus eiffingeri* (Rhacophoridae), in a bamboo forest. *Zoological Studies* **47**: 129-137.
- Lin, Y. S., R. M. Lehtinen, and Y. C. Kam. 2008. Time- and context-dependent oviposition site selection of a phytotelm-breeding frog in relation to habitat characteristics and conspecific cues. *Herpetologica* **64**: 413-421.
- Lyon, B. E., and J. McA. Eadie. 2008. Conspecific brood parasitism in birds: a life-history perspective. *Annual Reviews of Ecology, Evolution and Systematics* **39**: 343-63.
- Macdougall-Shackleton, E. A., R. J. Robertson, and T. P. Boag. 1996. Temporary male removal increases extra-pair paternity in eastern bluebirds. *Animal Behaviour* **52**: 1177-1183.
- Martof, B. S. 1953. Territoriality in the green frog, *Rana clamitans*. *Ecology* **34**: 165-175.
- Milligan, B. G. 2003. Maximum-likelihood estimation of relatedness. *Genetics* **163**: 1153-1167.
- Mokany, A., and R. Shine. 2003. Oviposition site selection by mosquitoes is affected by cues from conspecific larvae and anuran tadpoles. *Austral Ecology* **28**: 33-37.
- Møller, A. P. 1990. Changes in the size of avian breeding territories in relation to the nesting cycle. *Animal Behaviour* **40**: 1070-1079.
- Murphy, C. G. 1992. The mating system of the barking treefrog (*Hyla gratioiosa*). Ph. D. Dissertation, Cornell University, Ithaca.

- Murphy, C. G. 1994. Chorus tenure of male barking treefrogs, *Hyla gratiiosa*. *Animal Behaviour* **48**: 763-777.
- Neudorf, D. L., and S. G. Sealy. 1992. Reactions of four passerine species to threats of predation and Cowbird parasitism: enemy recognition or generalized response? *Behaviour* **123**: 84-105.
- Newton, I., and M. Marquiss. 1982. Fidelity to breeding area and mate in sparrowhawks, *Accipiter nisus*. *Journal of Animal Ecology* **51**: 327-341.
- Ng, M. Y., and H. M. Wilbur. 1995. The cost of brooding in *Plethodon cinereus*. *Herpetologica* **51**: 1-8.
- Olendorf, R., and S. K. Robinson. 2000. Effectiveness of nest defence in the Acadian flycatcher *Empidonax vireescens*. *Ibis* **142**: 365-371.
- Olsson, M., R. Shine, T. Madsen, A. Gullberg, and H. Tegelström. 1996. Sperm selection by females. *Nature* **383**: 585.
- Parker, G. A. 1990a. Sperm competition games: raffles and roles. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences* **242**: 120-126.
- Parker, G. A. 1990b. Sperm competition games: sneaks and extra-pair copulations. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences* **242**: 127-133.
- Petranka, J. W. 1990. Observations on nest site selection, nest desertion, and embryonic survival in marbled salamanders. *Journal of Herpetology* **24**: 229-234.
- Petranka, J. W., and D. A. G. Thomas. 1995. Explosive breeding reduces egg and tadpole cannibalism in the wood frog, *Rana sylvatica*. *Animal Behaviour* **50**: 731-739.
- Redmond, L. J., M. T. Murphy, A. C. Dolan, and K. Sexton. 2009. Parental investment theory and nest defense by Eastern Kingbirds. *The Wilson Journal of Ornithology* **121**: 1-11.
- Rowe, K. M. C., and P. J. Weatherhead. 2007. Social and ecological factors affecting paternity allocation in American robins with overlapping broods. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **61**: 1283-1291.

- Rudolf, V., and M. Rödel. 2005. Oviposition site selection in a complex and variable environment: the role of habitat quality and conspecific cues. *Oecologia* **142**: 316-325.
- Ryan, M. J. 1980. Female mate choice in a Neotropical frog. *Science* **209**: 523-525.
- Sargent, R. C., and M. R. Gross. 1986. William's principle: an explanation of parental care in teleost fishes. In: *The behaviour of teleost fishes* (Ed. by Pitcher, T.), pp. 275-293. London: Croom Helm Publishers.
- Schjorring, S., J. Gregersen, and T. Bregnballe. 1999. Prospecting enhances breeding success of first-time breeders in the great cormorant, *Phalacrocorax carbo sinensis*. *Animal Behaviour* **57**: 647-654.
- Simmons, L. W., J. D. Roberts, and M. A. Dziminski. 2009. Egg-jelly influences sperm motility in the externally fertilizing frog, *Crinia georgiana*. *Journal of Evolutionary Biology* **22**: 225-229.
- Soler, J. J., and M. Soler. 2000. Brood-parasite interactions between great spotted cuckoos and magpies: a model system for studying coevolutionary relationships. *Oecologia* **125**: 309-320.
- Spieler, M., and K. E. Linsenmair. 1997. Choice of optimal oviposition sites by *Hoplobatrachus occipitalis* (Anura: Ranidae) in an unpredictable and patchy environment. *Oecologia* **109**: 184-199.
- Sullivan, B. K., M. J. Ryan, and P. A. Verrell. 1995. Female choice and mating system structure. In *Amphibian biology*, vol. 2. Social behavior, ed H. Heatwole and B. K., Sullivan, 469-517. Chipping Norton, New South Wales, Australia: Surrey Beatty and Sons.
- Switzer, P. V. 1997. Past reproductive success affects future habitat selection. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **40**: 307-312.
- Tornick, J. K. 2010. Factors affecting aggression during nest guarding in the Eastern Red- Backed Salamander (*Plethodon cinereus*). *Herpetologica* **66**: 385-392.

- Travis, J., J. A. Farr, S. Henrich, and R. T. Cheong. 1987. Testing theories of clutch overlap with the reproductive ecology of *Heterandria Formosa*. *Ecology* **68**: 611-623.
- Trivers, R. L. 1972. Parental investment and sexual selection. In *Sexual Selection and the Descent of Man*, ed. B. G. Campbell, 136-179. Chicago: Aldine Press.
- Ueda, H. 1986. Reproduction of *Chirixalus eiffingeri* (Boettger). *Scientific Reports of Laboratory for Amphibian Biology, Hiroshima University* **8**: 109-116.
- Vergara, P., J. I. Aguirre, J. A. Fargallo, and J. A. Davila. 2006. Nest-site fidelity and breeding success in white stork *Ciconia ciconia*. *Ibis* **148**: 672-677.
- Vieites, D. R., S. Nieto-Roman, M. Barluenga, A. Palanca, M. Vences, and A. Meyer. 2004. Post-mating clutch piracy in an amphibian. *Nature* **431**: 305-308.
- Wada, T. 1994. Factors affecting nest re-use in the Rufous Turtle Dove *Streptopelia orientalis*. *Japanese Journal of Ornithology* **42**: 41-51.
- Wang, J. 2004. Sibship reconstruction from genetic data with typing errors. *Genetics* **166**: 1963-1979.
- Wang, J. 2011. COANCESTRY: a program for simulating, estimating and analysing relatedness and inbreeding coefficients. *Molecular Ecology Resources* **11**: 141-145.
- Ward, M. P. 2005. Habitat selection by dispersing yellow-headed blackbirds: evidence of prospecting and the use of public information. *Oecologia* **145**: 650-657.
- Wassersug, R. 1971. On the comparative palatability of some dry-season tadpoles from Costa Rica. *American Midland Naturalist* **86**: 101-109.
- Watts, B. D. 1987. Old nest accumulation as a possible protection mechanism against search-strategy predators. *Animal Behaviour* **35**: 1566-1568.

- Well, K. D. 1978. Courtship and parental behavior in a Panamanian poison-arrow frog, *Dendrobates auratus*. *Herpetologica* **34**: 148-155.
- Westmoreland, D., L. B. Best, and D. E. Blockstein. 1986. Multiple brooding as a reproductive strategy: time-conserving adaptations in mourning doves. *Auk* **103**: 196-203.
- Yasui, Y. 1998. The 'genetic benefits' of female multiple mating reconsidered. *Trends in Ecology and Evolution* **13**: 246-250.
- 莊國碩。1998。艾氏樹蛙生殖生物學之研究。國立台灣師範大學碩士論文。



## 表目錄

表 1	艾氏樹蛙重複產卵竹筒雄蛙與雌蛙採集和分析的樣本數量。	51
表 2	艾氏樹蛙重複產卵兩批子代親子關係分析使用的 5 個微衛星基因座特性。	52
表 3	艾氏樹蛙重複產卵樣本兩批子代採集和分析的數量。	53
表 4	2007-2009 年艾氏樹蛙重複產卵兩批子代的親子關係分析結果。	54
表 5	艾氏樹蛙重複產卵竹筒之餵卵雌蛙與子代的親子關係。	55
表 6	共同餵食蝌蚪之雌蛙的成對 R 值。	56
表 7	Coancestry 2.0 軟體中各種親緣關係的理論 R 值。	57

## 圖目錄

- 圖 1 艾氏樹蛙重複產卵雌蛙撫育行為觀測之竹筒陷阱照片。  
-----58
- 圖 2 艾氏樹蛙蝌蚪餵卵前後腹部照片。-----59
- 圖 3 重複產卵竹筒中，參與產第一批子代的雄蛙再利用同一竹筒進行生殖與否的比例。-----60
- 圖 4 重複產卵竹筒中，參與產第一批子代的雌蛙再利用同一竹筒進行生殖與否的比例。-----61
- 圖 5 2007-2009 年 64 窩艾氏樹蛙重複產卵第一批子代的數量分布。-----62

表 1 艾氏樹蛙重複產卵竹筒雄蛙與雌蛙採集和分析的樣本數量。

	2007			2008			2009		
	樣本數	雄蛙	雌蛙	樣本數	雄蛙	雌蛙	樣本數	雄蛙	雌蛙
採集數量	18	11	0	19	25	22	27	48	31
分析數量	4	4	0	6	9	8	14	26	22

表 2 艾氏樹蛙重複產卵兩批子代親子關係分析使用的 5 個微衛星基因座特性(Chen *et al.* 2011)。

基因座	重複單元	引子序列(5'→3')	黏合溫度	對偶基因長度範圍(bp)	對偶基因數目	排除機率	無效等位基因頻率	定型錯誤機率
<i>CEd12365</i>	CT	GGCCTCTCCACACAAGTT CAGTGCCAGCCCTCAT	52	88-124	13	0.459	0.0356	0.0127
<i>CEd15688</i>	GT	GAAAACCTGCAGCCAAACC TTGTGTCAATGTGAAGTCAAC	52	82-126	17	0.565	0.0964	0.0253
<i>CEd13854</i>	CT,AT	CCGGCAGATTGTATCGTGTA AGGCTTCTGATCAAATGTTGG	52	96-134	18	0.630	0.0808	0
<i>CEd19091</i>	CTAT	CTGCGGCAACAACTGCGTCA CTAGAGAGCGAGAAAGT	50	145-257	23	0.736	0.0460	0
<i>CEd19063</i>	CTAT	GGGATGTCATTGATGCTCATATGC GGCTGGCTGCAAATGGCTCTCAAC	52	161-297	21	0.392	0.0232	0.0260



表 3 艾氏樹蛙重複產卵樣本兩批子代採集和分析的數量。

	第一批 子代 採集數量	第一批 子代 分析數量	五個 loci 皆完成數量	第二批 子代 採集數量	第二批 子代 分析數量	五個 loci 皆完成數量
<b>2007</b>						
N27	21	21	12	59	36	34
I20	10	10	10	52	52	42
I04-1	12	11	7	29	29	23
B12	16	16	13	25	21	11
<b>2008</b>						
G39	32	20	20	68	20	20
B70	15	15	15	44	20	20
H01	12	10	10	38	17	17
H14	13	12	11	32	20	20
J31	14	13	12	10	8	8
I43	12	11	9	28	20	20
<b>2009</b>						
Y146	19	19	15	66	20	16
A01	23	20	20	33	20	20
X01	11	11	11	88	20	19
Y98	17	12	10	45	20	19
Z22	23	19	17	32	20	17
A02	10	9	9	34	10	8
Y95	37	20	20	42	20	20
Y42	25	15	14	59	20	17
Y133	6	6	6	95	20	18
Y39	6	6	6	42	16	16
Y12	12	10	10	60	20	18
Y50	19	20	19	18	13	13
Y74	17	13	11	33	18	17
Y07B	14	14	14	21	20	18
總和	<b>24</b>	<b>396</b>	<b>333</b>	<b>1053</b>	<b>500</b>	<b>451</b>

備註：2007 年選定 4 窩重複產卵樣本，其分析的子代數量為子代存活的數量。  
2008、2009 年分別選定 6 和 14 窩重複產卵樣本，若子代採集的數量多於

20 隻則分析 20 隻子代，若子代數量不足 20 隻則分析子代存活的數量。

表 4 2007-2009 年艾氏樹蛙重複產卵兩批子代的親子關係分析結果。

	2007	2008	2009	合計
			Z22	
異父 異母	N27 I04-1	H01 J31	A02 Y42	7
異父 同母	-	-	Y98 Y74	2
異父 部分同母	-	-	Y39	1
同父 異母	-	H14 I43	Y50	3
部分同父 異母	I20 B12	G39 B70	A01 X01 Y12	7
同父 同母	-	-	Y07B	1
同父 部分同母	-	-	Y133	1
部分同父 部分同母	-	-	Y146	1

備註：表內代碼為竹筒編號。



表 5 艾氏樹蛙重複產卵竹筒之餵卵雌蛙與子代的親子關係。

竹筒 編號	第一批子代 (蝌蚪) 採集數量	餵卵雌蛙 編號	第一批子代* (蝌蚪) 分析數量	第二批子代* (卵) 分析數量	母子關係
		f2404	10/11	0	
X01	11	f2302	0	19/19	異母
		f2420	0	0	
		f2042	0	0	
Y146	19	f3011	7/15	0	部分同母
		f2032	4/15	16/16	
		f3054	0	0	
A01	23	f4013	6/20	0	異母
Z22	23	f0302	17/17	0	異母
A02	10	f3025	0	8/8	異母
Y42	25	f0203	13/14	0	異母
Y133	6	f2013	0	7/18	部分同母
Y39	6	f2051	1/6	16/16	部分同母
Y98	17	f3013	10/10	19/19	同母

備註：“\*”分數是代表在分析的子代總數中，有多少是某雌蛙的子代。

例如：竹筒 Y146，在 15 隻的第一批子代中，有 7 和 4 隻分別是 f3011 和 f2032 的子代。

表 6 共同餵食蝌蚪之雌蛙的成對 R 值。

竹筒編號	雌蛙編號 1	雌蛙編號 2	R 值
A01	f3054	f4013	0.1391
Y146	f2042	f3011	0.0611
Y146	f2042	f2032	0
Y146	f2032	f3011	0
X01	f2404	f2302	0.2147
X01	f2404	f2420	0.2012
X01	f2302	f2420	0.1617

備註：Coancestry 軟體可執行 7 種成對個體的親緣關係估計方法，本表的數據選取 DyadML 估計方法所得的結果。

表 7 Coancestry 軟體中各種親緣關係的理論 R 值。

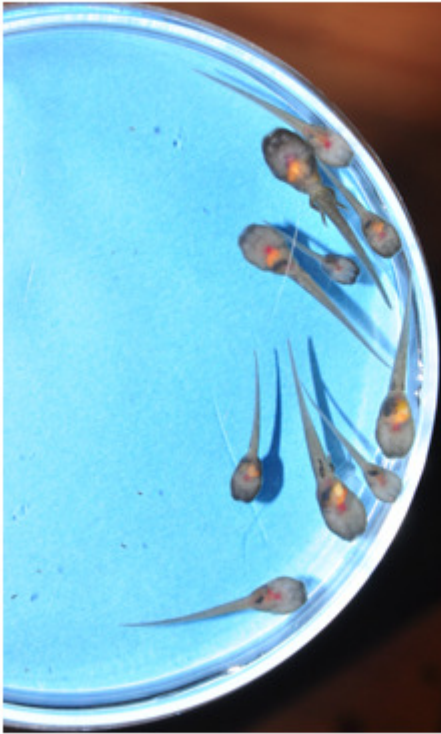
親緣關係	R 值
同卵雙胞胎(monozygotic twins)	1
親代與子代關係(parent-offspring)	0.5
親兄弟姊妹(fullsibs)	0.5
同父不同母或同母不同父的兄弟姊妹(halfsibs)	0.25
祖父母與孫子的關係(grandparent-grandchild)	0.25
雙重的堂或表兄弟姊妹(double first cousins)	0.25
堂或表兄弟姊妹(first cousins)	0.125
相同曾祖父母的表親(second cousins)	0.03125
無親緣關係(unrelated)	0

備註：本表修改自 Coancestry 1.0 軟體使用手冊的表 1。



圖 1 艾氏樹蛙重複產卵雌蛙撫育行為觀測之竹筒陷阱照片。陷阱的製作模仿 Kam *et al.* (2000)的漏斗狀陷阱。

(a)



(b)

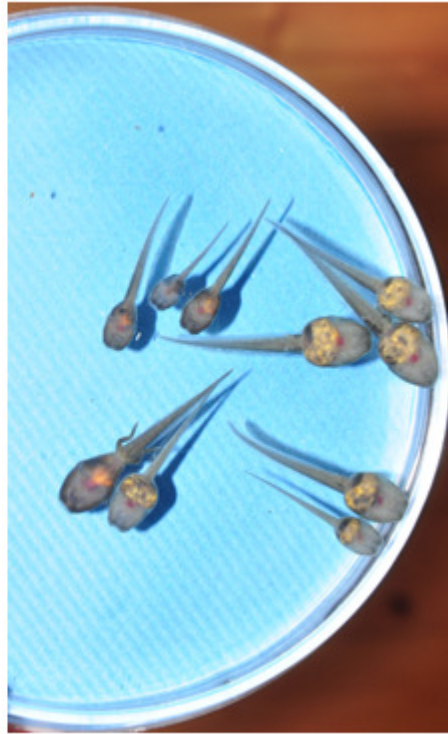


圖 2 艾氏樹蛙蝌蚪餵卵前後腹部照片，(a)餵卵前 (b)餵卵後。此樣本為竹筒 Y39 雌蛙編號 f2051 於 8 月 21 日回竹筒餵卵。

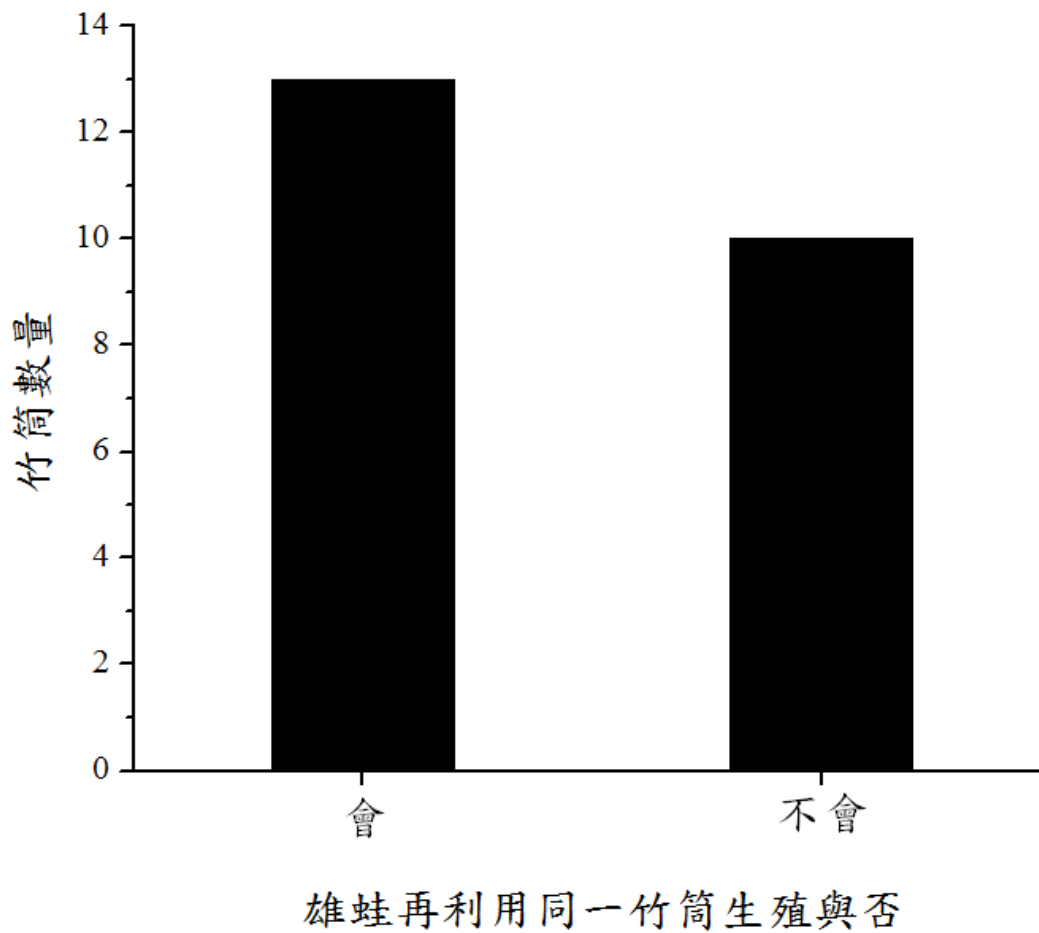


圖 3 重複產卵竹筒中，參與產第一批子代(蝌蚪)的雄蛙再利用同一竹筒進行生殖與否的比例。卡方檢定顯示兩者比例沒有顯著的差異(Chi-square test,  $X^2=0.3913$ ,  $p=0.5316$ ,  $N=23$ )。

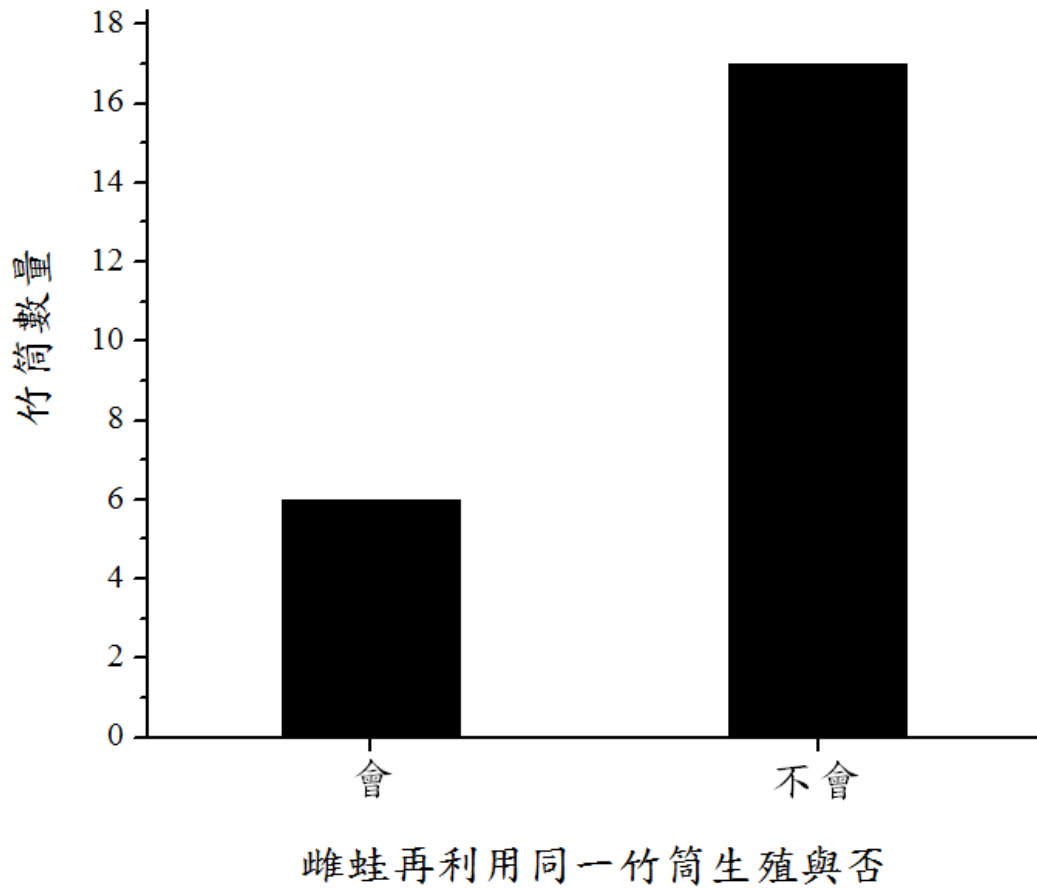


圖 4 重複產卵竹筒中，參與產第一批子代(蝌蚪)的雌蛙再利用同一竹筒進行生殖與否的比例。卡方檢定顯示兩者比例有顯著的差異 (Chi-square test,  $X^2=5.2609$ ,  $p=0.0218$ ,  $N=23$ )。

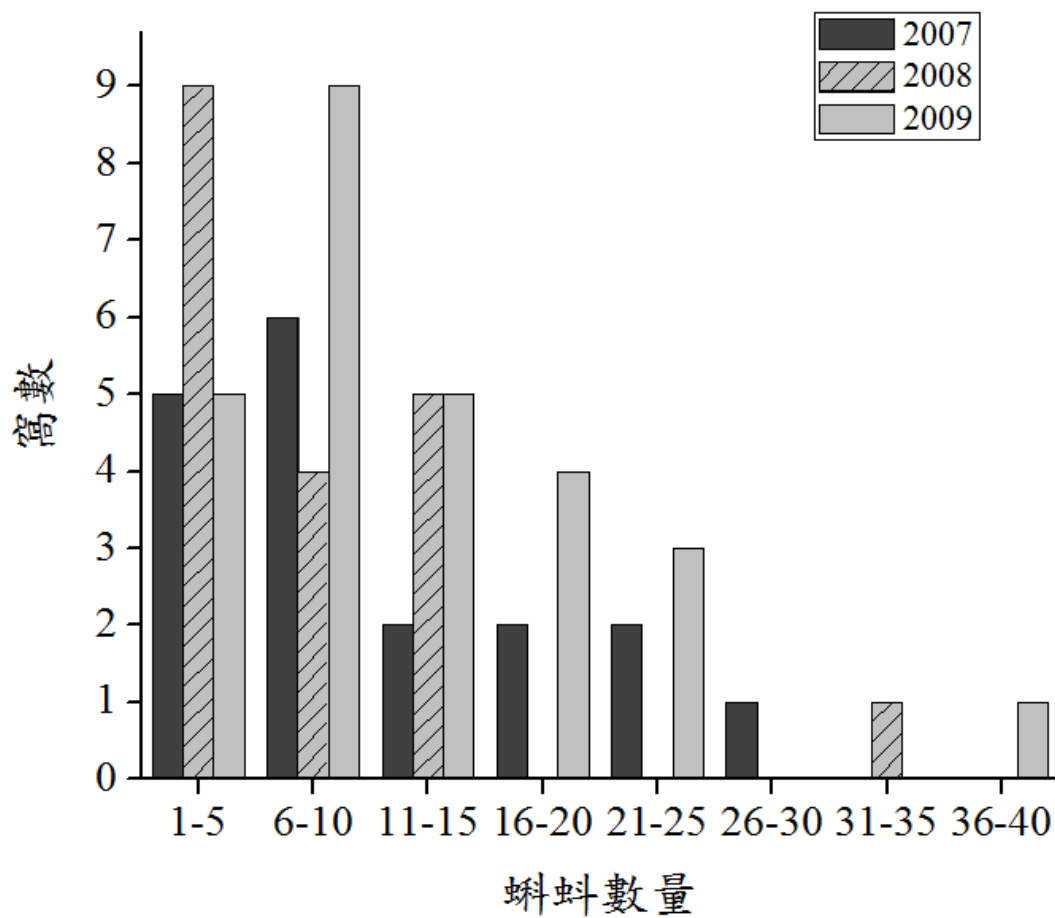


圖 5 2007-2009 年 64 窩艾氏樹蛙重複產卵第一批子代(蝌蚪)的數量分布。蝌蚪的數量介於 2-37 隻，平均為  $10.5 \pm 7.6$  隻。



附錄 2007-2009 年艾氏樹蛙重複產卵兩批子代親子關係分析總表

竹筒 編號	採樣 日期	第一批子代 或 第二批子代	期數	護卵 雄蛙	蝌蚪數 或 卵數	分析的 子代數	五個 loci 皆完成數目	親代組合 (COLONY)	兩批子代的關係 (COLONY)
N27	2007/5/27	1	26-29		21	21	12	m1xf2(12)	<b>異父異母</b>
		2	21	m3402	59	36	34	m3402xf1(34)	
I20	2007/5/26	1	-		10	10	10	m1xf1(7) m2xf1(1) m2xf2(1) m2xf3(1)	<b>部分同父異母</b>
		2	20	m4204	52	52	42	m4204xf4(32) m4204xf5(5) m2xf4(4) m2xf5(1)	
I04-1	2007/5/5	1	-		12	11	7	m1xf2(6) m2xf3(1)	<b>異父異母</b>
		2	-	m4202	29	29	23	m4202xf1(23)	
B12	2007/6/22	1	-		16	16	13	m1xf2(13)	<b>部分同父異母</b>
		2	-	m4025	25	21	11	m4025xf1(10) m1xf1(1)	

竹筒 編號	採樣 日期	第一批子代 或 第二批子代	期數	護卵 雄蛙	其他 成蛙	蝌蚪數 或 卵數	分析的 子代數	五個 loci 皆 完成數目	親代組合 (COLONY)	兩批子代的關係 (COLONY)
G39	2008/7/2	1	30-42			32	20	20	m4440xf1(7) m1xf1(13)	<b>部分同父異母</b>
		2	-	m4440		68	20	20	m4440xf4420(20)	
f4420										
B70	2008/7/2	1	42-27			15	15	15	m1xf1(11) m1xf2(3) m4340xf1(1)	<b>部分同父異母</b>
		2	-	m4340		44	20	20	m4340xf3(20)	
H01	2008/7/22	1	26-37			12	10	10	m1xf1(4) m1xf2(6)	<b>異父異母</b>
		2	-	m3230		38	17	17	m3230xf0314(17)	
f0314										
H14	2008/7/2	1	26-37			13	12	11	m4330xf1(8) m4330xf2(2) m4330xf3(1)	<b>同父異母</b>
		2	-	m4330		32	20	20	m4330xf3240(19) m4330xf4(1)	
f3240										

竹筒 編號	採樣 日期	第一批子代 或 第二批子代	期數	護卵 雄蛙	其他 成蛙	蝌蚪數 或 卵數	分析的 子代數	五個 loci 皆 完成數目	親代組合 (COLONY)	兩批子代的關係 (COLONY)
J31	2008/6/24	1	26-42			14	13	12	m1xf1(6) m2xf1(4) m3xf1(2)	<b>異父異母</b>
		2	24			10	8	8	m4xf4402(8)	
f4402										
I43	2008/5/2	1	27-29			12	11	9	m3403xf3404(5) m1xf3404(4)	<b>同父異母</b>
		2	25	m3403		28	20	20	m3403xf1(13) m1xf1(7)	
f3404										

竹筒 編號	採樣 日期	第一批子代 或 第二批子代	期數	護卵 雄蛙	交配 成蛙	其他 成蛙	蝌蚪數 或 卵數	分析的 子代數	五個 loci 皆完 成數目	親代組合 (COLONY)	兩批子代的關係 (COLONY)
Y146	2009/7/25	1	-				19	19	15	m2033xf3011(7) m1xf1(4) m1xf2032(4)	部分同父部分同母
		2	-	m2033	f2032		66	20	16	m2033xf2032(16)	
f3011											
A01	2009/7/12	1	42-26				23	20	20	m2041xf1(5) m1xf1(9) m2xf4013(6)	部分同父異母
		2	20				33	20	20	m2xf2(20)	
f4013											
m2041											
X01	2009/3/28	1	26-27				11	11	11	m1xf2404(10) m2xf1(1)	部分同父異母
		2	10	m2402			88	20	19	m2402xf2302(9) m2xf2302(3) m3xf2302(7)	
f2404											
f2302											

竹筒 編號	採樣 日期	第一 批子代 或 第二 批子代	期數	護卵 雄蛙	其他 成蛙	蝌蚪數 或 卵數	分析的 子代數	五個 loci 皆 完成數目	親代組合 (COLONY)	兩批子代的關係 (COLONY)
Y98	2009/7/21	1	26			17	12	10	m1xf3013(10)	異父同母
		2	10			45	20	19	m2xf3013(19)	
f3013										
Z22	2009/7/9	1	42-26			23	19	17	m1xf0302(9)	異父異母
		2	-	m2210		32	20	17	m2210xf1(17)	
m2205										
f0302										
A02	2009/7/29	1	-			10	9	9	m1xf1(4)	異父異母
		2	15-16	m2053		34	10	8	m2053xf3025(8)	
f3025										
Y42	2009/6/27	1	26			25	15	14	m1xf0203(13)	異父異母
		2	15-16			59	20	17	m0201xf2(17)	
m0201										
f0203										

竹筒 編號	採樣 日期	第一批子代 或 第二批子代	期數	護卵 雄蛙	交配 成蛙	其他 成蛙	蝌蚪數 或 卵數	分析的 子代數	五個 loci 皆 完成數目	親代組合 (COLONY)	兩批子代的關係 (COLONY)
Y133	2009/7/10	1	27-30				6	6	6	m2230xf1(1) m1xf2(3) m2230xf2(2)	<b>同父部分同母</b>
		2	17	m2230			95	20	18	m2230xf2(7) m2230xf2013(6) m1xf2(4) m1xf2013(1)	
f2013											
Y39	2009/7/29	1	26				6	6	6	m4440xf1(5) m4440xf2051(1)	<b>異父部分同母</b>
		2	-	m2045	f2051		42	16	16	m2045xf2051(16)	
m4440											
Y12	2009/6/28	1	28-29				12	10	10	m2330xf2(8) m1xf2(2)	<b>部分同父異母</b>
		2	10	m2330			60	20	18	m2330xf1(18)	
Y50	2009/6/6	1	42-26				19*	20	19	m2440xf2(18) m2440xf1(1)*	<b>同父異母</b>
		2	11	m2440			18	13	13	m2440xf1(13)	

竹筒 編號	採樣 日期	第一子代 或 第二子代	期數	護卵 雄蛙	其他 成蛙	蝌蚪數 或 卵數	分析的 子代數	五個 loci 皆 完成數目	親代組合 (COLONY)	兩批子代的關係 (COLONY)
Y74	2009/6/13	1	26			17	13	11	m1xf1(11)	異父同母
		2	22	m2450		33	18	17	m2450xf1(17)	
Y07-B	2009/5/17	1	-			14	14	14	m2405xf2310(14)	同父同母
		2	-	m2405		21	20	18	m2405xf2310(17)	
f2310										

備註：“-”表示沒有子代期數資料

“\*”該個體不是為第一批的蝌蚪，而是第二批的卵