

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

## 艾氏樹蛙親子關係分析及親代撫育之研究(2/3)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC93-2311-B-029-002-

執行期間：93年08月01日至94年07月31日

執行單位：東海大學生命科學系

計畫主持人：關永才

計畫參與人員：陳怡惠

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 94 年 5 月 30 日

## 行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中報告

艾氏樹蛙親子關係分析及親代撫育之研究(2/3)

Parentage Analysis and Parental Care of *Chirixalus eiffingeri*(2/3)

計畫編號：：NSC 93-2311-B-029-002

執行期間：93 年 8 月 1 日至 94 年 7 月 31 日

主持人：關永才 私立東海大學生物學系 教授

計畫參與人員：陳怡惠 國立台灣大學動物學研究所 研究生

### 中文摘要

本研究目的是以艾氏樹蛙(*Chirixalus eiffingeri*)為對象，利用自行開發的 DNA 分子遺傳標記—微隨體(microsatellite)，鑑定提供撫育的親代(護卵雄蛙、餵卵雌蛙)及被撫育子代(竹筒中受精卵或蝌蚪)的親子關係，研究樹棲蛙類親代撫育行為的策略及演化。本年度我們以自行建立艾氏樹蛙部分基因組資料庫的方式，完成開發具有多樣性的微隨體基因座為分子遺傳標記。結果得到 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，以電腦程式 CERVUS 作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。此外，本年度我們也完成野外雄蛙護卵觀察實驗，分析雄蛙護卵行為的時間形式及功能。並以微隨體基因座為遺傳標記鑑定護卵雄蛙與竹筒中受精卵的親子關係，初步結果顯示護卵雄蛙應是受精卵的父親。

### English Abstract

*Chirixalus eiffingeri* is an arboreal breeding rhacophorid frog with unique parental care behaviors. We developed 11 polymorphic microsatellites as genetic makers for parentage analysis to resolve the ecology of parental care. 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*. Male *C. eiffingeri* provided attendance during embryonic period. We found males were present in nests with clutches more frequently during the night than the day. We analyzed the relationship by polymorphic microsatellites makers between an attendant male and the embryos of a clutch. The results demonstrated that embryos of clutch were offspring belonging to the attendant male.

## 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)。而生活在樹洞的蝌蚪可能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(Ueda 1986; Lannoo et al. 1987; Weygold 1987; Brust 1993; Junfer 1996)。至今已知約有 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(Lannoo et al. 1987; Thompson 1992)。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.) (呂和陳 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. 1997; 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; 陳 1998; 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(borroding)、吃掉或移除受感染或不正常的卵以及抵禦外來者(Wells 1981; Townsend et al. 1984)。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 (莊 1988)，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。

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議題，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應用遺傳標記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 (marker) 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)。本研究採用微隨體為遺傳標記來做親子關係鑑定，今年度工作是：(1)完成艾氏樹蛙微隨體基因座的篩選工作；(2)觀察艾氏樹蛙雄蛙的撫育行為及活動型式；(3)應用微隨體基因座作為鑑定護卵雄蛙與竹筒中受精卵的親子關係。

## 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1016公尺，年平均溫度約  $17^{\circ}\text{C}$ ，年雨量約為3000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 (Kam et al. 1996)，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。

## 2. DNA 萃取

基因體(genomic)DNA 之萃取為將艾氏樹蛙組織，先用剪刀剪碎或用研鉢研杵磨成粉末狀，加入 2 毫升(ml)的溶解緩衝液(lysis buffer; 50mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 200mM NaCl, 1% SDS, pH 8.0)及 50 $\mu$ l 蛋白質溶解酵素(Proteinase K; 10mg/ml)。混合均勻後，置於 55 $^{\circ}$ C 水浴加熱至組織完全溶解。最後加入 20 $\mu$ l RNA 分解酵素(RNase, 10mg/ml)在 55 $^{\circ}$ 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 緩衝溶液中，保存於-20 $^{\circ}$ C 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; Scribner and Pearce, 2000)。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](http://www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3)。

html) (Rozen and Skaletsky, 1996)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)的溫度等條件測試，PCR產物以自動定序儀(automated sequencer) MegaBase 500 (Amersham)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 Schlotterer 2003)計算艾氏樹蛙每個微隨體基因座的對偶基因數目，及其異結合型觀察值(observed heterozygosity, Ho)及異結合型期望值(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，一週兩次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)。

用剪趾法(toe-clipping)採樣竹筒中護卵雄蛙的指頭及受精卵,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

以組織樣本萃取的DNA為模版,利用篩選出的微隨體基因座之引子做PCR,產物以自動定序儀做基因型判讀後,鑑別護卵雄蛙是否為竹筒中受精卵的父親。

## 結果與討論

### 1. 微隨體基因座的多型性

微隨體基因座的篩選工作已經完成,報告發表於2005年的Molecular Ecology Notes (Chen et al. 2005)。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。

### 2. 雄蛙的護卵行為

利用野外觀察的方式,觀察艾氏樹蛙雄蛙撫育行為,獲得的基礎生態資料結果整理如下:

#### (1) 護卵的型式及功能

依據317個clutches的3256次nest checks,我們發現看護卵的成體皆是雄性,並無雌性擔任此工作。雄蛙來去竹筒似乎沒有特定的時間型式, Bickford (Bickford 2001)將之稱為intermittent attendance。所有有受精卵的竹筒中,以兩小時為分隔,雄蛙出現在竹筒看護卵的時間型式如fig. 1。若將觀察時間只區分為日、夜間時,分析雄蛙待在竹筒的比例,發現夜間時雄蛙留在竹筒的比例較日間為高( $\chi^2=73.6, df=1, P < 0.01$ ) (fig. 2)。

317 clutches 中有137個是不曾發現有雄蛙出現的(unattended nests),棄巢率為43.2%。和其他物種比較時,艾氏樹蛙的棄巢率是相當高的(Woodruff 1977; Simon 1983; Townsend et al. 1984; Lehtinen 2003; Bickford 2004)。我們將clutch的命運分為成功及失敗,大於等於1顆卵成功孵化為蝌蚪的clutch,即定義為成功,否則為失敗。依據288個知道最後命運的clutches,有雄蛙看護與沒有的clutches之命運沒有顯著差異( $\chi^2=0.079, df=1, P=0.78$ ) (fig. 3)。因為受精卵沒有雄蛙看護也會成功孵化,因此這種看護行為應屬於非絕對性的親代撫育(non-obligated or facultative paternal care)。

雄蛙看護卵期間會以腹部沾濕卵塊各部位,推測有提供水分給受精卵的功能

(Wells 1981; Townsend et al. 1984)。對陸上及樹上產卵的兩棲類而言，受精卵水分的維持是存活及發育的一項重要因素 (Duellman and Trueb 1986)。對艾氏樹蛙的受精卵而言，水分對孵化率及發育的速度都有相當重要的影響(Kam et al. 1998)。雖然比較有、無雄蛙看護的 clutch 命運時，看不出最後 clutch 能否孵化的差異，但雄蛙提供水分的行為也許與受精卵發育速度有關，但在這項比較中無法證實。

## (2)親子關係判定

目前我們完成 1 隻雄蛙與其看護的 10 個受精卵的 6 個微隨體基因型定型，其基因型如 table 2。由目前所獲得的基因型來看，受精卵應是屬於護卵雄蛙的子代。且因為受精卵的對偶基因只有 4 種，所以應屬於同一隻母蛙的後代。由目前結果來看，應用微隨體在艾氏樹蛙的親子判定上應是可行的。

由於動物組織的量相當少，因此在做 PCR 時，有些微隨體基因座會有擴增的困難，特別是對偶基因較大的基因座。常需重新調整 PCR 條件，或需作二次 PCR 擴增才能成功。且量少的 DNA 在做 PCR 時，需重複多做幾次 PCR，才能確保基因型定型的正確性(Taberlet et al. 1996)。因此，基因型定型是相當耗時的工作，需投入更多的時間去進行。

## 未來一年的工作項目

1. DNA 的品質決定了基因座定型的成功率與正確性。在能獲得的動物組織量相當少的情況下，需投入比一般樣本更多的時間去進行。未來持續進行雄蛙的護卵行為資料分析，及持續進行 DNA 粹取及微隨體基

因座之基因型判定，分析護卵的雄蛙與竹筒中蝌蚪的親子關係，探討艾氏樹蛙雄蛙護卵及生殖策略。

2. 進行母蛙撫育行為的野外夜間觀察及標放實驗，並以微隨體基因座基因型判定餵食雌蛙與竹筒中蝌蚪的親子關係分析，瞭解雌蛙親代撫育的形式及策略。

## 參考文獻

- Avise JC (1994) *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman & Hall, New York.
- Avise JC, Jones AG, Walker D and DeWoody JA (2002) Genetic mating systems and reproductive natural histories of fishes: lesson for ecology and evolution. *Annual Review of Genetics* 36:19-45.
- Bickford DP (2001) The ecology and evolution of parental care in the microhylid frogs of New Guinea. In: University of Miami, Coral Gables, Florida
- Bickford DP (2004) Differential parental care behaviors of arboreal and terrestrial microhylid frogs from Papua New Guinea. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 55:402-409.
- Brust DG (1993) Maternal brood care by *Dendrobates pumilio*: A frog that feeds its young. *Journal of Herpetology* 27:96-98.
- Chen Y-H, Kam Y-C and Yu H-T (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.
- Dieringer D and Schlotterer C (2003) MICROSATELLITE ANALYSER (MSA): A platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. *Molecular Ecology Notes* 3:167-169.
- Duellman WE and Trueb L (1986) *Biology of amphibians*. McGraw-Hill, New York, USA.
- Hughes C (1998) Integrating molecular techniques with field methods in studies of social behavior: A revolution results. *Ecology* 79:383-399.
- Junfer 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 and Tsai I-R (2000) Maternal brood care of an arboreal breeder, *Chirixalus eiffingeri* (Anura: Rhacophoridae) from Taiwan. *Behaviour* 137:137-151.
- Kam YC, Chen YH, Chuang ZS and Huang TS (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 YC, Chuang ZS and Yen CF (1996) Reproduction, oviposition-site selection, and tadpole oophagy of an arboreal nester, *Chirixalus eiffingeri* (Rhacophoridae), from Taiwan. *Journal of Herpetology* 30:52-59.
- Kam YC, Yen CF and Hsu CL (1998) Water balance, growth, development, and survival of arboreal frog eggs (*Chirixalus eiffingeri*, Rhacophoridae): importance of egg distribution in bamboo stumps. *Physiological Zoology* 71:534-40.
- Laessle AM (1961) A micro-limnological study of Jamaican bromeliads. *Ecology* 42:499-517.
- Lannoo MJ, Townsend DS and Wasswesu 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 Zoology* 38:1-31.
- Lehtinen RM (2003) Parental Care and Reproduction in Two Species of *Mantidactylus* (Anura: Mantellidae). *Journal of Herpetology* 37:766-768.
- Marshall TC, Slate J, Kruuk LE and Pemberton JM (1998) Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology* 7:639-55.
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89:583-590.
- Queller DC and Goodnight KF (1989) Estimating relatedness using genetic markers. *Evolution* 43:258-275.
- Queller DC, Strassmann JE and Hufhes CR (1993) Microsatellite and kinship. *Trends in Ecology and Evolution* 8:285-288.
- Raymond M and Rousset F (1995) GENEPOP (Version 1.2): Population genetics software for exact tests and



- ecumenicism. *Journal of Heredity* 86:248-249.
- Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T (1989) *Molecular cloning: A laboratory Manual*, 2 nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Simon MP (1983) The ecology of parental care in a terrestrial breeding frog from New Guinea. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 14:61-67.
- Taberlet P, Griffin S, Goossens B, Questiau S, Manceau V, Escaravage N, Waits LP and Bouvet J (1996) Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucleic Acids Res* 24:3189-94.
- Thompson TL (1992) Reproductive Behaviors and Larva Natural History of the Jamaican Brown Frog, *Osteopilus brunneus*(Hylidae). In: University of Florida, Gainesville, Florida, USA..
- Townsend DS, Stewart MM and Pough H (1984) Male parental care and its adaptive significance in a neotropical frog. *Animal Behaviour* 32:421-431.
- Ueda H (1986) Reproduction of *Chirixalus eiffingeri* (Boettger). *Scientific Report of Laboratory in Amphibian Biology, Hiroshima University* 8:109-116.
- Wassersug RJ, Frogner KJ and Inger RF (1981) Adaptations for life in tree holes by Rhacophorid tadpoles from Thailand. *Journal of Herpetology* 15:41-52.
- Wells KD (1981) Parental behavior of male and female frogs. In: Alexander RD, Tinkle DW (eds) *Natural Selection and Social Behavior. Recent Research and New Theory*. Chiron Press, New York, pp 184-197.
- Westneat DF and Sherman PW (1993) Parentage and the evolution of parental behaviors. *Behavioral Ecology* 4:66-77.
- Westneat DF and Webster MS (1994) Molecular analysis of kinship in bird: interesting questions and useful techniques. In: Schierwater VB, Streit B, Wagner GP, DeSalle R (eds) *Molecular ecology and evolution: approaches and applications*. Birkhäuser, Basel; Boston.
- Weygold P (1987) Evolution of parental care in dart poison frogs (Amphibia, Anura, Dendrobatidae). *Zeitschrift für Zoologische Systematik und Evolutionsforschung* 25:51-67.
- Whittingham LA, Dunn PO and Robertson RJ (1993) Confidence of paternity and male parental care: an experimental study in tree swallows. *Animal Behaviour* 46:139-147.
- Woodruff DS (1977) Male postmating brooding behavior in three *Australian Pseudophryne* (Anura: Leptodactylidae). *Herpetologica* 33:296-303.
- 呂光洋、陳世煌 (1982) 台灣的兩棲類。山苑出版。
- 莊國碩 (1988) 艾氏樹蛙生殖生物學之研究。國立台灣師範大學。
- 陳怡惠 (1998) 艾氏樹蛙食卵性蝌蚪的種內競爭與母蛙撫育之研究。國立彰化師範大學。

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 GCTTGGCAAAACAGGTTACTT <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 CCAATGACAAAGTTGGGGT <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>	CCTGGTGTGAGGGGTTTTTA 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> TCAGGCCAGTCATTCACAAG	56.0	21	203,212	2	0.143	0.136	1.000	0.009	0.062
CEd06009 (AY853681)	(AC) <sub>8</sub>	AAGTTAACCCCTTGCAATGTCG <sup>HEX</sup> TGCCTTGTCTCCCCCTAGAC	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>	GGCTCTCACATCACCAAAA <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. Genotypes of the attendant male and clutch in the same bamboo culm.  
 Data are for one case that the attendant male and the embryos were typed  
 by 6 microsatellite loci. Genotypes of the mother are deduced from those of the  
 male and embryos.

Locus	Attendant male	Embryos	Deduced mother
<i>CEd02747</i>	<b>202/212</b>	<b>202/212</b>	<b>-/-*</b>
<i>CEd12365</i>	<b>92/112</b>	<b>92/94</b> <b>94/112</b> <b>88/92</b> <b>88/112</b>	<b>88/94</b>
<i>CEr00112</i>	<b>87/88</b>	<b>88/88</b> <b>87/88</b> <b>87/87</b>	<b>87/88</b>
<i>CEr00009</i>	<b>238/238</b>	<b>234/238</b>	<b>234/-*</b>
<i>CEr00006</i>	<b>137/271</b>	<b>137/271</b> <b>271/271</b> <b>137/137</b>	<b>137/271</b>
<i>CEd15688</i>	<b>83/103</b>	<b>83/97</b> <b>103/103</b>	<b>97/103</b>

\* -: the allele can not be deduced from the data.

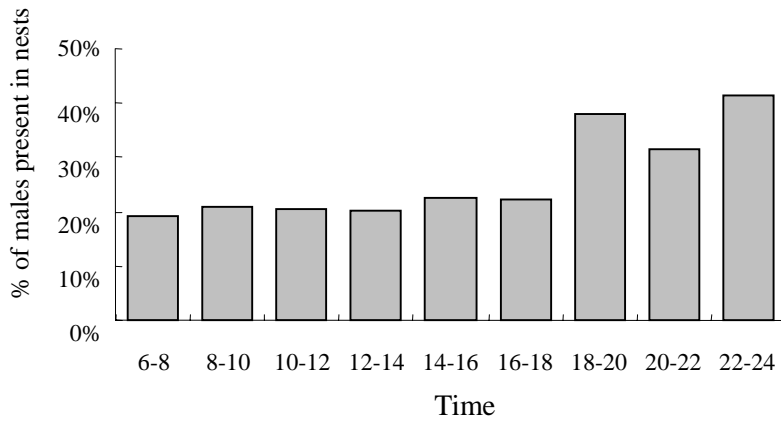


Fig. 1. Percent of males present in the nest with egg clutches in 24 h

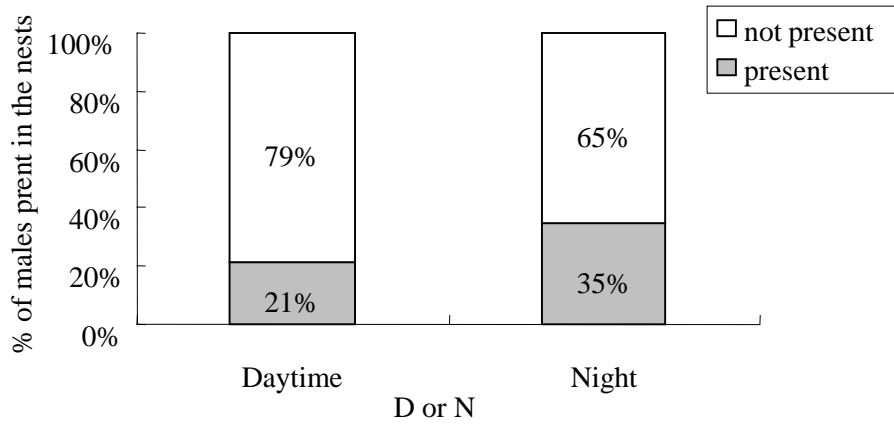


Fig. 2. Percent of male present in daytime and night

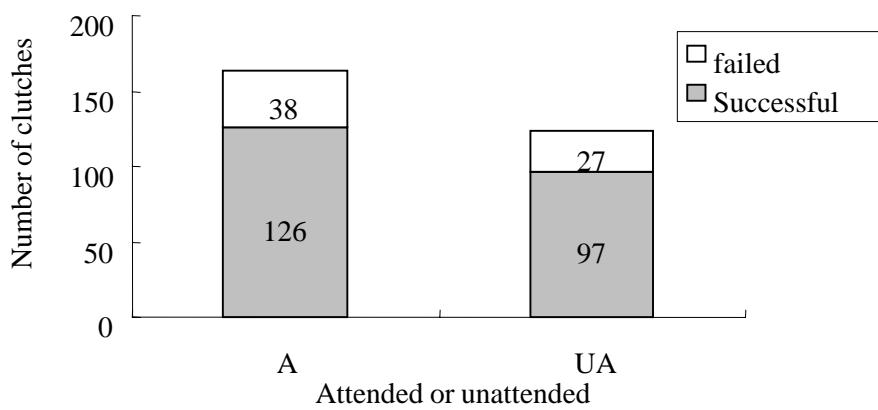


Fig. 3. Fate of egg clutches in attended and unattended nest