

東海大學生命科學系
碩士論文

指導教授：關永才 博士

Dr. Yeong-Choy Kam

趙偉廷 博士

Dr. Wei-Ting Chao



艾氏樹蛙雌蛙表皮的構造和功能
與親代照顧之關係探討

Integumentary structures and functions of female
Kurixalus eiffingeri in relation to maternal care

研究生：王利文

Li-Wen Wang

中華民國一百零四年七月

東海大學生命科學系碩士論文

艾氏樹蛙雌蛙表皮的構造和功能

與親代照顧之關係探討

Integumentary structures and functions of female

Kurixalus eiffingeri in relation to maternal care

研究生：王利文

Li-Wen Wang

指導教授：關永才 博士

Dr. Yeong-Choy Kam

趙偉廷 博士

Dr. Wei-Ting Chao

中華民國一百零四年七月

東海大學生命科學系
碩士論文學位考試審定書

生命科學系碩士班研究生 王利文 君所撰寫之論文

(中文)

艾氏樹蛙雌蛙表皮的構造和功能與親代照顧之關係探討

(英文)

Integumentary structures and functions of female *Kurixalus eiffingeri* in relation to maternal care

經本委員會審定通過，特此證明。

學位考試委員會

召集人

許富榮

(簽名)

委員

周永才

趙信廷

張原謀

陳怡惠

中華民國 104 年 9 月 24 日

誌謝

研究所的生活在經歷許多的波折之後，終於得以順利畢業了。

首先，感謝的是關永才老師，老師在學術領域的專業與實驗研究清晰的邏輯思考，使我每每在與老師討論之後，總有許多新的靈感與啟發，謝謝老師帶領著我前進，讓邏輯思考不甚清楚的我在研究領域中能有所小小的成長。感謝趙偉廷老師開啟了我進入組織與細胞的領域及其實驗室的魏婉貞助理與石濟民醫師帶領我並建立組織切片的實驗基礎。感謝洪佳儂學長在最後關鍵時刻帶領我做免疫組織化學的染色技術。感謝許富雄老師、張原謀老師、陳怡惠老師在我的口試時提供許多寶貴的建議，讓我對我的研究有不同面向的觀點，更使本論文更加完備。

感謝兩爬實驗室的好夥伴們，在實驗上提供許多寶貴意見與看法的萬事通豐哥、很多實驗點子的柔潔、有很好眼力幫我尋找艾氏樹蛙母蛙的奕凱和詠豪、提供實驗意見的冠達、協助修改英文文法的家郡、在專題預演前提供寶貴建議的猷威和全斌，以及一開始帶領我進入艾氏樹蛙領域的偉群學長、菟佐學長、婉萍學姊。感謝敏真、韻婷、昆璿、韋齊、雪芸等一起修課的好夥伴；還有一起出野外找面天樹蛙的真維和芝瑜，謝謝你們在實驗上的幫忙與討論，才能讓我的實驗更加的順利。

謝謝生命中的貴人—楊老師，勉勵我將研究所學業唸完，若沒有您，我想也不會有這樣轉變的我；還有常常關心我的好姐妹們；感謝眾娘娘們和神聖仙佛的庇佑，謝謝你們默默的幫助，成為我心靈上的莫大支持。

在這漫長的研究生活中，感謝家人們的無限支持，雖然常常回家都被問說甚麼時候可以畢業阿？雖然你們也不太懂我的青蛙到底有甚麼好研究的，但這就是生命與演化美妙的地方，真正一頭栽進去之後，才發現有這麼多有趣和好玩的知識。

最後，謝謝在此研究中犧牲奉獻的艾氏樹蛙與面天樹蛙，引起我對於組織的研究的興趣，開啟了組織研究的里程碑。



目錄

目錄	1
表目錄	2
圖目錄	3
中文摘要	4
英文摘要	6
前言	8
文獻探討	12
材料與方法	20
結果	29
討論	33
總結	44
參考文獻	45



表目錄

表一、艾氏樹蛙與面天樹蛙的樣本資料.....	55
表二、非繁殖季節艾氏樹蛙身體各部位表皮層厚度與核質比.....	56
表三、繁殖與非繁殖季節的艾氏樹蛙泄殖腔部位表皮層厚度與核質 比	57
表四、繁殖季節有和沒有撫育之艾氏樹蛙泄殖腔部位表皮層厚度與核 質比	58
表五、繁殖與非繁殖季節的艾氏樹蛙泄殖腔部位表皮層之泌乳激素受 體強度.....	59
表六、繁殖季節有和沒有撫育之艾氏樹蛙泄殖腔部位表皮層之泌乳激 素受體強度.....	60
表七、非繁殖季節面天樹蛙身體各部位表皮層厚度與核質比.....	61
表八、繁殖與非繁殖季節的面天樹蛙泄殖腔部位表皮層厚度與核質 比	62
表九、繁殖與非繁殖季節的面天樹蛙泄殖腔部位表皮層之泌乳激素受 體強度.....	63

圖目錄

- 圖一、免疫組織化學之泌乳激素受體染色強度……………64
- 圖二、組織化學之蘇木紫-伊紅染色結果與表皮構造說明 ……65
- 圖三、非繁殖季節艾氏樹蛙身體各部位的表皮構造切片圖(蘇木紫-伊
紅染色)……………66
- 圖四、非繁殖季節面天樹蛙身體各部位的表皮構造切片圖(蘇木紫-伊
紅染色)…………… 67
- 圖五、繁殖與非繁殖季節的艾氏樹蛙泄殖腔部位表皮構造切片圖
(蘇木紫-伊紅染色)…………… 68
- 圖六、繁殖季節有和沒有撫育之艾氏樹蛙泄殖腔部位表皮構造切片圖
(蘇木紫-伊紅染色)…………… 69
- 圖七、繁殖與非繁殖季節的艾氏樹蛙泄殖腔部位表皮構造切片圖
(泌乳激素受體染色)…………… 70
- 圖八、繁殖季節有和沒有撫育之艾氏樹蛙泄殖腔部位表皮構造切片圖
(泌乳激素受體染色)…………… 71
- 圖九、繁殖與非繁殖季節的面天樹蛙泄殖腔部位表皮構造切片圖
(泌乳激素受體染色)…………… 72

摘要

兩棲類的表皮為一複雜之器官。表皮組織在生殖過程中可特化並作為育卵場所或營養來源等親代照顧之功能。艾氏樹蛙(*Kurixalus eiffingeri*)蝌蚪啄咬雌蛙泄殖腔附近的表皮時，會使雌蛙產下未受精卵給子代食用。本研究的目的是想了解艾氏樹蛙雌蛙表皮的結構並探討其功能，以同屬近緣種且無親代照顧的面天樹蛙(*Kurixalus idiotocus*)雌蛙做為對照的物種。其研究問題如下：1) 身體各部位(頭部、背部、腹部及泄殖腔)的表皮構造差異，2) 在繁殖與非繁殖季的泄殖腔表皮構造差異，3) 有和沒有撫育的泄殖腔表皮構造差異，4) 在繁殖和非繁殖季節的泄殖腔表皮泌乳激素受體強度差異。以組織學方法觀察表皮結構並量化表皮層厚度及細胞核質比，並且計算表皮層泌乳激素受體的染色強度。研究結果發現，艾氏樹蛙腹部表皮層厚度最厚，推測腹部是蛙類調節身體水分與滲透恆定的重要部位；而艾氏樹蛙在繁殖季中的泄殖腔表皮層厚度和細胞核質比是顯著大於非繁殖季的，推測表皮層厚度的增加是由於細胞的增生活躍。相反的，面天樹蛙雌蛙雖然在繁殖季表皮厚度也有增加，但細胞核質比沒有變化。我推論這兩種物種表皮的差異可能和蝌蚪的乞食行為有關。另外，泌乳激素受體的強度在艾氏樹蛙繁殖季節中顯著大於非繁殖季節，但是面天樹蛙則沒有不同；我認為艾氏樹蛙在繁殖季節中泌乳激素受體的強度的增加

與雌蛙的親代照顧有關。許多研究已證實泌乳激素對於皮膚的生理過程扮演重要的角色，例如乳腺的發育和頭髮的生長；然而，泌乳激素是否參與艾氏樹蛙表皮的生理過程則需要更多的研究。



Abstract

Amphibian integument is a complex organ and plays a special role in reproduction. *Kurixalus eiffingeri* tadpoles nip the females integument (mainly around cloaca), and female then lays unfertilized eggs to feed her tadpoles. The purpose of this study was to assess the structures and functions of *K. eiffingeri* female integument. I used *Kurixalus idiootocus*, a closed-related with no tadpole feeding behavior, as a control species. Specifically, I assessed 1) epidermic thickness among body regions (head, dorsal, ventral, and cloacal); 2) cloacal epidermis between breeding and non-breeding females; 3) cloacal epidermis between nesting and non-nesting females; 4) prolactin receptor (PRLR) intensity in cloacal epidermis between breeding and non-breeding females. I used a light microscopy to observe and measured the thickness, cell size, and nuclear-cytoplasmic ratio (N:C ratio) of epidermis layer. Then I calculated the staining intensity of prolactin receptor (PRLR) in epidermis. Results showed that the epidermic thickness varied among body regions, and the ventral epidermis was the thickest and probably responsible for osmoregulation. Cloacal epidermal thickness and NC ratio of *K. eiffingeri* in breeding season are significantly higher than that of non-breeding season, indicating high levels of cell proliferation. On the contrary, *K. idiootocus* epidermis increased in thickness during breeding season but not in NC ratio. The difference in epidermic structures may relate to the egg-feeding behavior of female frogs. The PRLR intensities between breeding and non-breeding *K. eiffingeri* females were significantly different but not in *K. idiootocus*. I contend that PRLR

intensity increased in breeding *K. eiffingeri* may associate with maternal behavior of female frogs. Prolactin has been demonstrated to have importance effect on the physiological processes of skin, such as mammary glands development and hair growth, however, whether prolactin involves in physiological process of epidermis in *K. eiffingeri* needs further studies.



前言

表皮(integument)為生物體與外在環境的分界，除了保護與抵禦外來物質侵略的功能，同時亦具有感覺、溫度調節、分泌、呼吸等功能(Linzey 2012)。脊椎動物之表皮為適應生活之環境與生理功能之需求不同，在形態上產生相當大的差異(Fox 1994)；然而，對於棲息範圍在水域與陸域之過渡環境的兩棲類動物(amphibian)而言，表皮構造為一複雜的器官，具有形態、生化與生理上的功能(Fox 1994, Clark 1997)。

兩棲類的表皮構造與功能對個體的生存扮演著重要的角色。關於兩棲類表皮的形態與構造在過去已有許多的相關研究(Elias and Shapiro 1957, Parakkal and Matoltsy 1964, D'Istria et al. 1982, Kobelt and Linsenmair 1986, Fox 1994, de Brito-Gitirana and Azevedo 2005, Felseburgh et al. 2007)；在功能方面，目前已知兩棲類的表皮扮演著呼吸、防禦、水份調節，更特別的是扮演著生殖(reproduction)上的功能(Fox 1994, Houck and Sever 1994, Clark 1997)。以表皮做為親代照顧行為是相當特殊的功能，如負子蟾(*Pipa carvalhoi*)雌蟾的背部皮膚會特化做為孵卵的腔室(egg chambers)(Fernandes et al. 2011)；環管蚓螈(*Siphonops annulatus*)幼體會啄咬親代雌性的表皮做為食物來源(Wilkinson et al. 2008)。

艾氏樹蛙(*Kurixalus eiffingeri*)是台灣蛙類中，唯一利用樹上積水池(phytotelmata)進行生殖且具有特殊的雄蛙護卵(egg attendance)與雌蛙餵卵(tadpole feeding)的親代照顧行為之無尾目物種。當竹筒壁上的蝌蚪孵化掉入竹筒積水池之後，雌蛙便會定時回巢餵食蝌蚪，前人觀察蝌蚪會聚集並且啄咬雌蛙泄殖腔周圍的皮膚(Ueda 1986)，隨後雌蛙會排放未受精卵提供子代食用，且蝌蚪為絕對食卵性(obligatory oophagy)，即蝌蚪只吃雌蛙產下的未受精卵當作唯一的食物(Ueda 1986, Kam et al. 1996, Kam et al. 1997, Kam et al. 2000, Kam and Yang 2002)。Kam and Yang (2002)證實艾氏樹蛙雌蛙和蝌蚪之間有交互作用，透過實驗操作與行為觀察發現了蝌蚪在雌蛙與蝌蚪一起浸泡過的水中(conditioned water)之活動量顯著比單獨浸泡過雌蛙的水中的活動量高，他們推測雌蛙和蝌蚪之間存在著化學溝通(communication)，並提出這是一項新的發現。

以產下未受精卵做為子代食物來源的餵食蝌蚪的方式，此現象除了發現在艾氏樹蛙這種樹棲性的蝌蚪(arboreal tadpoles)之外，在箭毒蛙屬的草莓箭毒蛙(*Dendrobates pumilio*) (Weygoldt 1980)及樹蟾科的棘無囊蛙(*Anotheca spinosa*)蝌蚪(Jungfer 1996)同樣也有以未受精卵當做蝌蚪的食物來源。Jungfer (1996)研究棘無囊蛙(*A. spinosa*)蝌蚪和雌蛙之間的親代照顧行為，結果顯示觸覺刺激(tactile stimulation)對雌

蛙來說是必要的且在這樣的刺激之下會使雌蛙產下未受精卵。

綜合過去的研究，我推測表皮構造可能具有親子間溝通的功能，但對於兩棲類的表皮構造在親子間溝通所扮演的角色為何所知仍是相當有限。目前大部分的研究著重在雌蛙和蝌蚪之間的行為研究，幾乎很少有研究以組織或細胞的層面去探討如此特殊的親代照顧行為。前人研究發現觸覺刺激對雌蛙來說是產下未受精卵的重要訊號，那麼泄殖腔附近的表皮組織在受到蝌蚪大量聚集啄咬的狀況下，表皮的結構應會有特化或改變。此外，由於激素(hormone)也可能會影響或促使雌性個體的生殖行為，有許多研究證實泌乳激素(prolactin, PRL)在魚類、哺乳類與兩棲類扮演著求偶、生殖與親代照顧的角色(Bole-Feysot et al. 1998, Kikuyama and Toyoda 1999, Whittington and Wilson 2013)，因此本研究欲透過組織切片與偵測表皮層的泌乳激素受體(prolactin receptor, PRLR)，藉此探討表皮結構在艾氏樹蛙雌蛙親代照顧上所扮演的功能為何。

面天樹蛙(*Kurixalus idiootocus*)與艾氏樹蛙雖然屬於近緣種(Brown et al. 2010)，但是面天樹蛙則完全不具有任何親代照顧的行為。在繁殖季期間，雌雄個體交配後會將卵產在潮濕土壤中，之後便不具有任何撫育行為，因此本研究中也觀察面天樹蛙的表皮結構當作實驗對照組，進而探討表皮結構在親代照顧中所扮演的角色。

本研究目的是透過組織石蠟包埋切片方法測量及分析艾氏樹蛙與面天樹蛙各部位的表皮層厚度及細胞核與細胞質的面積比例(核質比)，並以免疫組織化學染色的方法，偵測泌乳激素受體在表皮結構的分布位置與定量受體的染色強度。欲探討問題如下：

1.艾氏樹蛙與不具有親代照顧行為的近緣種面天樹蛙的頭部、背部、腹部與泄殖腔的表皮構造是否有差異？

2.繁殖與非繁殖季節的艾氏樹蛙泄殖腔部位的表皮構造是否有差異？

3.繁殖季節期間有和沒有撫育之艾氏樹蛙泄殖腔部位的表皮構造是否有差異？

4.繁殖與非繁殖季節的艾氏樹蛙泄殖腔表皮層泌乳激素受體的強度是否有差異？

5.繁殖季期間有和沒有撫育之艾氏樹蛙泄殖腔表皮層泌乳激素受體的強度是否有差異？

6.繁殖與非繁殖季節的面天樹蛙泄殖腔部位的表皮構造是否有差異？

7.繁殖與非繁殖季節的面天樹蛙泄殖腔表皮層泌乳激素受體的強度是否有差異？

文獻探討

一、兩棲類表皮的功能與構造

兩棲類在面臨複雜的環境與為了適應生存之棲地，其表皮已演化出具有適應多變環境的特質(Duellman and Trueb 1994, Fox 1994, Houck and Sever 1994, Clark 1997, Felseburgh et al. 2007)。目前已知兩棲類表皮扮演著許多的功能，包含了呼吸(Duellman and Trueb 1994)、機械性的保護(Fox 1994)、化學性的防禦(Clark 1997)、離子的運輸(Linsenmair et al. 1999)與水分的吸收(Clark 1997)，更特別的是扮演著個體在求偶或親代照顧上的角色(Houck and Sever 1994)。由此可知兩棲類表皮為一複雜且高度組織化的器官(Fox 1994)。

兩棲類的表皮構造反映其所棲息的環境(Houck and Sever 1994, Greven et al. 1995)，認識表皮組織的構造有助於對兩棲類生存環境的了解。兩棲類表皮的構造是由表皮層(epidermal layer)與真皮層(dermal layer)所組成，兩層之間的由基底膜(basement membrane)做分隔(Fox 1994)；表皮層由2至3層的上皮細胞(epithelial cells)構成(Farquhar and Palade 1964, Fox 1994)，表皮層由接近外在環境的最外層至最內層依序可再分：具有減少水分散失功能的角質層(stratum corneum)、顆粒層(stratum granulosum)、棘細胞層(stratum spinosum)與可不斷進行細胞分裂的基底層(stratum basale)。位在表皮層下方的是真皮層，可分

為上下兩層：上層是由的疏鬆結締組織(loose connective tissue)構成的海綿真皮層(spongy dermis)，主要由膠原蛋白纖維(collagen fibers)和彈性纖維(elastin fibers)構成，此區域亦有黑色素細胞(melanophore)、血管(blood vessel)、神經(nerve)分布，還有使體表保持濕潤並協助呼吸的黏液腺體(mucus gland)與具有分泌毒液以進行防禦的顆粒腺體(granular gland)，腺體具有導管開口可通至體表；而下層為緻密真皮層(compact dermis)，主要是由數層的膠原蛋白(collagen fibers)構成 (Duellman and Trueb 1994, Fox 1994, de Brito-Gitirana and Azevedo 2005, Azevedo et al. 2006)。

兩棲類可藉由表皮的特化來適應多樣的環境與生活棲地(Fox 1994)，因此表皮組織構造的特化或改變(integumentary modifications)對兩棲類而言是相當重要的。非洲蘆葦蛙(*Hyperolius viridiflavus*)在面對乾燥環境的條件之下，角質層做為對抗乾季時(dry season)的主要屏障(Geise and Linsenmair 1988)，亦會分泌一層薄薄的乾燥黏液(dried mucus)覆蓋在體表面，用以降低身體水分的散失(Geise and Linsenmair 1986)。少數樹蟾科(Hylidae)的物種，例如美國樹蟾(*Hyla cinerea*)、松鼠蟾(*Hyla squirella*)及犬吠蛙(*Hyla gratiosa*)會有擦拭身體背部皮膚的行為，這行為促使脂肪(lipid)分泌至體表面且構成了在表皮層之外(extra-epidermal layer)的防水層(waterproof)，主要目的是為了防止身

體水分的散失(Blaylock et al. 1976, Lillywhite et al. 1997, Barbeau and Lillywhite 2005)。表皮層厚度在物種之間及物種內有厚度上的差異(Greven et al. 1995)，對於棲息水域環境的非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)最厚的部位是背部和腹部，但是對大部分生存於陸域環境的大蟾蜍(*Bufo bufo*)而言卻是最薄的部位，不同部位的厚度的差異與表皮層細胞層數的多寡有關(Brown et al. 1981)。Azevedo 等人(2006)以組織學的方式觀察美洲牛蛙(*Rana catesbeiana*)和黃蟾蜍(*B. ictericus*)緻密真皮層的結構，結果顯示呈現緊密的排列並由平行的膠原蛋白薄板(lamellae)和垂直的膠原蛋白柱(column)所組成，作者指出膠原蛋白柱(column)可使緻密真皮層強化堅固，並扮演著對個體機械性保護的角色。

二、兩棲類親代照顧行為的類型與表皮構造的特化

親代照顧(parental care)是指任何能夠增加子代生存的照顧行為(Clutton-Brock 1991)。目前已知魚類、鳥類、爬蟲類、哺乳類及兩棲類等動物具有親代照顧的行為(Clutton-Brock 1991)。兩棲類親代照顧的演化和適應陸域繁殖有關且已具有多樣化的形式，一般將親代照顧分為下列類型：看護卵(egg attendance)、搬運卵(egg transport)、看護蝌蚪(tadpole attendance)、搬運蝌蚪(tadpole transport)、餵食蝌蚪

(tadpole feeding)(Crump 1995)。

上述部分親代照顧的類型與兩棲類表皮的結構和其所扮演的功能有關。以下即針對前人研究與表皮構造或特化有關之親代照顧類型歸納如下：

(1)搬運卵(egg transport)：

大部分水生的負子蟾科(Pipidae)的雌性個體，例如蘇利南蟾(*P. pipa*)和卡氏負子蟾(*P. carvalhoi*)具有獨特的親代照顧行為(Greven and Richter 2009, Fernandes et al. 2011)，牠們的背部表皮可特化出撫育的腔室(brood chamber)，使受精卵得以孵化成蝌蚪。經由組織切片的結果發現撫育期雌蟾的背部表皮缺乏角質層，在真皮層部分則缺乏緻密真皮層，只有以海綿真皮層構成的疏鬆結締組織，推測這可以使卵更容易植入雌蟾的背部表皮(Greven and Richter 2009)，有利於親代照顧的進行。樹蟾科(Hylidae)囊蛙屬(*Gastrotheca*)的物種，角囊蛙(*G. cornuta*)和里氏囊蛙(*G. riobambae*)(del Pino et al. 1975)雌性個體的背部會特化出育兒袋(pouch)，交配受精後雄蛙利用後腳將受精卵放入育兒袋中，可使受精卵得以在袋內發育，當蝌蚪即將孵化時，雌蛙到水邊並用後腳趾把育兒袋打開，然後利用後腳將蝌蚪從袋中掏出來釋放到水裡，完成蝌蚪期(del Pino 1980)。

(2)搬運蝌蚪(tadpole transport)：

箭毒蛙科(Dendrobatidae)的物種，例如彩胸毒蛙屬(*Colostethus* spp.)的雄性個體具有親代照顧的行為，孵化的蝌蚪會擺動(wriggle)到雄性個體背部，並藉由黏液腺體使蝌蚪與雄性背部黏合(adhesives)，這有利於雄性個體將蝌蚪搬運到其他鳳梨科植物或是其他水體中繼續生存(Wells 1981)。雄性澳洲囊蛙(*Assa darlingtoni*)的側邊腹股溝凹陷的囊袋構造(lateral inguinal invaginations)，除了可使受精卵孵化為蝌蚪，亦可使剛孵化的蝌蚪在囊中變態為小蛙，經由組織切片結果發現囊袋具有高度的血管化而且黏液腺體的分泌有增多的趨勢(Ingram et al. 1975)。

(3)餵食子代(tadpole feeding)：

以表皮餵食做為子代的食物來源，這特殊的親代照顧形式發現生存於地底的真蚓科(Caeciliidae)物種，例如環管蚓螈(*S. annulatus*) (Wilkinson et al. 2008)和泰塔山蚓螈(*Boulengerula taitanus*) (Kupfer et al. 2006)。觀察有撫育的雌性個體，牠們的表皮顏色比沒有撫育的個體更呈現出較為暗淡的灰色(paler)，幼體可藉由特化的牙齒刮取母體表層的皮膚，經由組織切片與染色證實雌性個體最外層的角質層富含蛋白質且表皮層具有脂肪體。

三、 泌乳激素與親代照顧行為之關係

泌乳激素(prolactin, PRL)為多肽荷爾蒙(polypeptide hormone)，由腦下垂體(pituitary gland)合成和分泌。泌乳激素為一跨膜蛋白(transmembrane protein)，在正常的情況之下，泌乳激素會和泌乳激素受體(prolactin receptor, PRLR) 鍵結，一連串的訊號路徑受到刺激，因此引起目標組織或細胞表現出生理上的反應(physiological responses)(Bole-Feysot et al. 1998)。泌乳激素的功能為調節許多物種的不同的生理活性，在許多脊椎動物的組織和器官都有被發現(Clarke and Bern 1980)。Bole-Feysot 等人(1998)將泌乳激素的功能整理如下：(1)水分和電解質的平衡(water and electrolyte balance)、(2)個體的成長和發育(growth and development)、(3)內分泌與新陳代謝(endocrinology and metabolism)、(4)大腦和行為的調節(brain and behavior)、(5)免疫調節與保護(immunoregulation and protection)、(6)生殖(reproduction)。其中，與物種親代照顧行為較為相關的部分是在大腦和行為的調整中的親代照顧的行為(parental behavior)，在生殖部分則是親代對子代的育幼行為(nurturing of young)。

泌乳激素在魚類、兩棲類、鳥類與哺乳類等物種中扮演生殖與親代照顧的角色(Schradin and Anzenberger 1999, Bender et al. 2008)。對魚類而言，將黃盤棕麗魚(*Symphysdon aequifasciata*)親魚注射泌乳

激素後，會啟動相關的親代照顧行為，當注射較高劑量的泌乳激素時，會使親代表皮的黏液細胞分泌的量增加並做為子代的食物來源之一；但是只要對親魚注射低劑量的泌乳激素時，便會出現搨卵(fanning)的現象(Blüm and Fiedler 1965)。泌乳激素亦會參與魚類的遷徙行為，促使三棘刺魚(*Gasterosteus aculeatus*)從海水遷移到淡水進行生殖(Lam and Hoar 1967)。在鳥類方面，會影響雌野鴿(ring doves)的護巢(nest attendance)和孵卵(incubation)行為，注射低劑量的泌乳激素便會使得雌性個體孵卵的天數增加(Janik and Buntin 1985)，亦會使之反芻餵食(regurgitation feeding)幼鴿(Buntin et al. 1991)。在哺乳動物中，泌乳激素引起雌性大鼠(rats)增加對子代的理毛行為(grooming)(Drago et al. 1981)。

對兩棲類而言，泌乳激素則是扮演著滲透調節、生理、求偶與生殖的角色(Brown et al. 1991, Kikuyama and Toyoda 1999)。Inceli 等人(2010)以組織切片證實湖側褶蛙(*Rana ridibunda*)的背部皮膚和腹部皮膚皆有泌乳激素受體的分布，泌乳激素對此種蛙類來說扮演水分和電解質的平衡角色。Li 等人(2006)以膠體電泳與西方墨點法的方式研究蟾蜍的泌乳激素受體表現量，結果發現乾燥環境的處理條件之下，盤古蟾蜍(*B. bankorensis*)與黑眶蟾蜍(*B. melanostictus*)的皮膚的泌乳激素受體表現量(prolactin receptor expression)會增加，另外經由組織

切片結果證實泌乳激素受體和黏液腺體分泌有關，因此在乾燥環境之下除了會使這兩種蟾蜍泌乳激素受體表現量增加之外，亦會分泌較多的黏液腺體以減少個體的水分蒸散。在睪固酮(testosterone)和泌乳激素的作用之下，會誘發虎紋頓口螈幼體(*Ambystoma tigrinum*)的泄殖腔和真皮層的腺體增生，有助於個體的生長(Norris et al. 1989)。研究指出，泌乳激素會改變蝾螈物種的行為，當腦部泌乳激素的濃度升高時，會促使蝦夷山椒魚(*Hynobius retardatus*)個體主從陸域遷移到水生(water-drive)的棲地以進行求偶與繁殖的行為(Moriya 1982)。



材料與方法

一、物種介紹

艾氏樹蛙為樹棲性之小型蛙類，是溪頭地區常見之物種，利用積水的竹筒或樹洞繁殖。由於溪頭地區竹林中的竹子定期受到砍伐，砍伐後剩餘的竹節便會形成竹筒，降雨過後使竹筒形成一暫時性的小型積水池，成為艾氏樹蛙理想之繁殖場所(林 1996)，故雨季時節，即每年的二月至九月(Kam et al., 1996)，為艾氏樹蛙之繁殖季節。

面天樹蛙廣泛分布於中低海拔山區，與艾氏樹蛙為近緣種，但卻沒有雙親撫育行為(Brown et al., 2010)。牠們棲息於樹林底層或是土堆中、路邊水溝的溝渠等，交配成功後，雌蛙常將卵產於落葉堆或是泥地中。

二、野外採集與飼養

(一)艾氏樹蛙

於 2011 年至 2012 年 7 至 9 月艾氏樹蛙之繁殖季期間至南投縣鹿谷鄉台大實驗溪頭營林區的竹林捕捉，共計雄蛙 30 隻、雌蛙 15 隻。攜回實驗室之後飼養於飼養箱中，每箱飼養 1 隻雌蛙與 2 隻雄蛙，觀察與記錄雄蛙與雌蛙之生殖行為，以及在蝌蚪孵化之後，雌蛙餵食蝌蚪的親代撫育行為。飼養箱之長 42cm、寬 27cm、高 30cm，於底部

鋪上 2cm 桎石，並加入 2cm 高的水以保持箱內潮濕。箱中種植黃金葛，放置加有半滿水的水盆及一個裝有水的竹筒，竹筒內的水離竹筒口約 3cm，平日放置若干麵包蟲做為食物來源，一星期則餵食一次蒼蠅。將光週期設定為光照 12 小時、黑暗 12 小時，箱內溫度維持在 20°C 至 24°C。非繁殖季之樣本是將個體攜回實驗室後馴養至非繁殖季。在本研究中，艾氏樹蛙的樣本總數共 15 隻，包括繁殖季中具有親代撫育的雌蛙 5 隻及繁殖季中不具有親代撫育的雌蛙 5 隻、非繁殖季之雌蛙 5 隻。繁殖季有親代撫育的樣本採用的是親代撫育後期階段(第五週或第六週)的雌蛙。

(二)面天樹蛙

於 2012 年 7 月面天樹蛙之繁殖季期間至南投縣魚池鄉所捕捉，共計 20 隻母蛙。攜回實驗室之後飼養於飼養箱中。飼養箱之長 42cm、寬 27cm、高 30cm，於底部鋪上 2cm 桎石，並加入 2cm 高的水以保持箱內潮濕。箱中種植黃金葛，放置加半滿水的水盆，平日放置若干麵包蟲做為食物來源，一星期則餵食一次蒼蠅。將光週期設定為光照 12 小時、黑暗 12 小時，箱內溫度維持在 20°C 至 24°C。非繁殖季之樣本為則是將動物攜回實驗室後馴養至非繁殖季。本研究中，面天樹蛙樣本數共 18 隻，繁殖季 12 隻及非繁殖季為 6 隻。

三、石蠟組織切片與染色

(一)樣本包埋及組織切片

所有組織樣本使用石蠟包埋(paraffin-embedded)方法，依序步驟為固定、脫水、清洗、浸潤、滲蠟、包埋及切片的過程。

首先將個體以乙醚迷昏，隨後取得 0.5 公分 x 0.5 公分方形大小之頭部、背部、腹部與泄殖腔部位的表皮組織並置於 4% 甲醛溶液中(paraformaldehyde ; PA)進行固定 1 小時。之後以酒精進行脫水(dehydration)，目的是將表皮組織中的游離水脫除，酒精濃度由低至高遞增，依序為 10% 酒精、20% 酒精、30% 酒精、50% 酒精、70% 酒精、95% 酒精，各 15 分鐘，最後 100% 酒精 30 分鐘。隨後進行清洗(clearing)使組織透明乾淨，配置不同比例的二甲苯(xylene)與酒精混合液，依序更替如下：二甲苯：100% 酒精=1：3、二甲苯：100% 酒精=1：1、二甲苯：100% 酒精=3：1，各別為 30 分鐘，最後則是二甲苯 1 小時並進入設定好之 62°C 烘箱中。在 62°C 烘箱中以石蠟(paraffin)作為浸潤組織之包埋劑，以便於組織切片之切取，並配置不同比例的二甲苯與石蠟之混合液，二甲苯：石蠟 =3：1、二甲苯：石蠟 =1：1、二甲苯：石蠟 =1：3，浸潤時間各別為 1 小時，最後為石蠟 1 小時。之後以 2 條 L 形金屬條將組織包埋(embedding)成為立方體的石蠟塊，待冷卻之後將蠟塊放入 4°C 冰箱冰存。

以石蠟切片機(LEICA, RM2025)將蠟塊先進行粗切，此厚度約為 10 至 20 微米(micrometer, μm)，直到快接近蠟塊中的樣本後，調整為 5 微米的厚度進行細切，以毛筆將連續成帶狀的切片平放至 40 °C 水浴槽水面，目的為使切片平展開來。將含有 Poly-Lysine 載玻片垂直放入水浴中，使連續之組織切片位於載玻片上，製作成玻片。

(二)蘇木紫-伊紅染色(Hematoxylin and Eosin stain ; H&E stain)

蘇木紫(Mayer's Hematoxylin)-伊紅(Sigma-Aldrich, Eosin Y solution, Alcoholic)染劑又稱為 H&E 染色，為組織學常用之染色方法之一。蘇木紫染劑為嗜酸性，可將細胞核染成藍紫色；伊紅染劑為嗜鹼性，可將蛋白質染成粉紅色。

染色方法依序為脫蠟、水洗、染色、脫水、封片。先將石蠟切片至於 62°C 烘箱中 10 分鐘，其目的為脫蠟，隨後在兩缸二甲苯中浸泡各 10 分鐘、兩缸 100%酒精各 2 分鐘、95%酒精 1 分鐘、80%酒精 1 分鐘，接著將切片置於流動自來水中沖洗 1 分鐘，再浸泡到蘇木紫染缸中 6 分鐘，接著取出切片於流動自來中水沖洗 1 分鐘，隨後以 0.6% 氫水 5 秒進行反藍作用，其目的為使細胞核呈藍色，接下來於流動自來中水沖洗 1 分鐘；再浸泡到伊紅染缸中 30 秒、80%酒精 1 分鐘、95%酒精 1 分鐘、兩缸 100%酒精各 2 分鐘，之後進行風乾 30 分鐘，

分別以二甲苯中分別浸泡 5 分鐘及 30 分鐘後，將玻片取出以樹膠進行封片，待玻片乾燥。玻片以光學顯微鏡觀察(Leica Galen III Microscope)，之後再以螢光干涉相位差顯微鏡(Axioskop 2 plus Microscope，ZEISS)拍攝。組織照片皆於 400 倍率下所拍攝，亦會拍攝在 400 倍率下的顯微測微尺，做為後續資料分析的比例尺。

(三)免疫組織化學染色(Immunohistochemistry stain；IHC stain)

本實驗的免疫組織化學染色參考與修改自 Inceli 等人(2010)的方法。以下實驗步驟所提及的試劑套組為 Small Volume Universal HRP Immunostaining Kit (購自美國 Diagnostic BioSystems 公司)。首先，將待染色之切片分別浸泡二甲苯中兩次，每次 5 分鐘，其目的為進行脫蠟，之後將切片依序放入 100%酒精、95%酒精、80%酒精中，各別浸泡 3 分鐘，然後進入二次蒸餾水中潤洗，隨後放置於煮沸的檸檬酸鹽緩衝液(citrate buffer)中 10 分鐘，使抗原再現(antigen retrieval)，以利與抗體結合，將切片置於室溫中冷卻 30 分鐘後，以磷酸鹽緩衝液(phosphate buffered saline；PBS)清洗兩次，每次 5 分鐘，之後以免疫染色用抗體標示筆(Liquid Blocker-Super PAP Pen)，為一種疏水性的筆，將同一玻片上的組織圈成兩塊組別，一組實驗組和一組對照組，且可避免之後加入的液體流出玻片外，亦可節省液體用量。隨後以 10% 胎

牛血清(fetal bovine serum ; FBS)作為阻斷液(blocking solution) , 置於濕潤盒中於室溫下作用 30 分鐘 , 再以 PBS 清洗 5 分鐘 , 並使用 3% 過氧化氫(hydrogen peroxide ; H₂O₂)作用 10 分鐘 , 用以去除組織內生性過氧化氫酵素(endogenous peroxidase)活性和防止之後抗體的非特異性結合 , 再以 PBS 清洗兩次 , 每次 5 分鐘。將已稀釋 300 倍的一級抗體(Prolactin receptor Ab-1 , Mouse Monoclonal Antibody , Catalog #MS-1338-R7 , 抗體購自美國 Thermo Scientific 公司)蓋滿玻片上所圈出的實驗組別 , 而對照組則加入 PBS , 作為 Negative control , 將玻片置於濕潤盒中並於 4°C 冷房中隔夜。當一級抗體作用完之後 , 以 PBS 清洗 20 分鐘 ; 然後加入二級抗體在室溫中作用 10 分鐘 , 再以 PBS 清洗 20 分鐘 ; 在組織上滴入 Enzyme conjugated 作用 15 分鐘後 , 以 PBS 清洗 5 分鐘 ; 隨後加入二氨基聯苯胺(diaminobenzidine ; DAB)呈色 10 分鐘 , 使有產生免疫反應的部分呈現咖啡色 , 再以 PBS 清洗 5 分鐘 ; 使用蘇木紫染劑染細胞核 , 以 PBS 清洗 20 分鐘。最後將玻片浸泡於 95%酒精 3 分鐘、100%酒精兩次 , 分別 2 分鐘、二甲苯兩次 , 各別為 3 分鐘 ; 之後以封片膠進行封片 , 放置於室溫下通風乾燥後即可於光學顯微鏡下觀察染色結果。玻片以光學顯微鏡觀察(Leica Galen III Microscope) , 之後再以螢光干涉相位差顯微鏡(Axioskop 2 plus Microscope , ZEISS)拍攝。組織照片皆於 400 倍率下所拍攝 , 亦

會拍攝在 400 倍率下的顯微測微尺，做為後續資料分析的比例尺。

四、資料分析

測量表皮層厚度(thickness)與細胞核質比(nucleo-cytoplasmic ratio ; N/C ratio)是以蘇木紫-伊紅染色的組織照片為主。每隻個體的不同部位都會製成三片呈現連續且長條帶的玻片，三片玻片分別進行三次的蘇木紫-伊紅染色，目的是確認三個玻片的染色呈色是在一定的範圍之內。染色完之後，每片玻片於光學顯微鏡 400 倍的倍率下拍攝一張照片，共得三張組織照片，之後以軟體 Image J (Abràmoff et al. 2004) 測量照片的表皮層的厚度(thickness)，表皮層厚度是指表皮到真皮之間的細胞厚度，將每張照片分成三等份的間隔，測量三個厚度的值，因此每隻個體不同部位的表皮層厚度都會有 9 個值，最後計算出 9 個數值的平均數值，此一平均數值即為個體部位的數值。表皮層的細胞核面積與細胞質面積的比例(N/C ratio)也是以軟體 Image J(Abràmoff et al. 2004)的色階方法計算，核質比(N/C ratio)為細胞核與細胞質的面積比，可判斷物種的細胞是否為活化狀態。Watanabe 等人(1983)指出細胞在進行增殖、生長和修補等活化的狀態時，染色體會解開呈絲狀染色質的形態，因此細胞核會增大，細胞質濃縮。

泌乳激素受體染色定量部分，每隻個體的不同部位製成三片呈現

連續且長條帶的玻片，三片玻片分別進行三次的泌乳激素受體染色，目的是確認三個玻片的染色強度是在一定的範圍之內，染色完之後，每片玻片於光學顯微鏡 400 倍的倍率下拍攝一張照片，共得三張組織照片，在個體的每張染色照片中，於一定的間隔設定 3 個九宮格，將九宮格設置於表皮層的位置，九宮格大小會隨著表皮層厚度而有所調整，九宮格面積範圍為 $15\mu\text{m} \times 15\mu\text{m}$ 至 $45\mu\text{m} \times 45\mu\text{m}$ 之間，再按照染色強度的標準(圖一)，在每個九宮格的 9 個小格子中給予染色強度的評估，並且計算出每個九宮格的 I 值， $I = 0*f_0 + 1*f_1 + 2*f_2 + 3*f_3$ ，其中，0、1、2、3 分別代表不同染色的強度(圖二)。強度 0 代表未偵測到泌乳激素受體(negative)，強度 1 表示偵測到微弱的受體(weak)，強度 2 表示偵測到中度的受體(moderate)，強度 3 為偵測到高度的受體(intense)； f_0 、 f_1 、 f_2 和 f_3 的值加起來為 1，代表 9 個格子分為 9 個等份(fraction； f)，例如：一個九宮格中，強度 0 的佔了 1/9、強度 1 的佔了 3/9、強度 2 的佔了 4/9、強度 3 的佔了 2/9，此 I 值為 1.88。 I 值的範圍為 0 到 3 之間，此定量方法參照 Elzagheid 等人(2006)的方法。因此，每隻個體泄殖腔的表皮層泌乳激素受體強度都會有 9 個值，最後計算出 9 個數值的平均數值，此一平均數值即為此個體的數值。

所有統計分析以 Statistica 10 (StatSoft Incorporated, Tulsa, USA) 軟體進行，統計顯著門檻設在 $\alpha=0.05$ 。以 Shapiro-Wilk test 檢視資料

之常態性，發現不符合常態分佈，所以我使用 Kruskal-Wallis test 無母數分析檢視艾氏樹蛙及面天樹蛙不同部位的表皮層厚度與細胞核質比的檢定，再利用多重比較來進行事後檢定，使用 Mann-Whitney U test 無母數分析檢視艾氏樹蛙及面天樹蛙不同繁殖狀態的表皮層厚度與細胞核質比的檢定。



結果

一、艾氏樹蛙與面天樹蛙採集的樣本

我將採集到的艾氏樹蛙與面天樹蛙之個體的體長和體重資料做分析(表一)。艾氏樹蛙繁殖期的平均體長為 36.75 ± 3.33 mm，平均體重為 3.90 ± 1.02 g，非繁殖期的平均體長為 35.72 ± 3.30 mm，平均體重為 3.61 ± 0.95 g。面天樹蛙繁殖期的平均體長為 34.96 ± 1.79 mm，平均體重為 2.54 ± 0.59 g，非繁殖期的平均體長為 33.69 ± 1.94 mm，平均體重為 1.98 ± 0.31 g。

二、組織結構的差異

艾氏樹蛙的頭部、背部、腹部、泄殖腔的表皮構造皆具有表皮層、真皮層、腺體與黑色素細胞(圖二)，面天樹蛙亦具有相同構造(圖二)。

艾氏樹蛙不同部位的表皮組織

艾氏樹蛙於非繁殖季時身體各部位之頭部、背部、腹部及泄殖腔的表皮層厚度有顯著的差異(Kruskal-Wallis test, $H=9.657$, $P=0.022$) (表二)，多重比較顯示腹部的表皮層厚度大於頭部($P=0.016$)；但是各部位之間的核質比則無顯著的差異(Kruskal-Wallis test, $H=1.708$, $P=0.635$) (表二)(圖三)。

艾氏樹蛙泄殖腔的部位

繁殖與非繁殖季時，艾氏樹蛙泄殖腔部位之表皮層厚度有顯著的差異(Mann-Whitney U test, $U=4$, $Z=-2.510$, $P=0.012$) (表三)，繁殖季的表皮層厚度顯著高於非繁殖季之表皮層厚度，且在核質比亦有顯著的差異(Mann-Whitney U test, $U=7$, $Z=-2.143$, $P=0.032$) (表三)，繁殖季的核質比亦顯著高於非繁殖季之核質比(圖五)。

於繁殖季時，有和沒有撫育之雌蛙泄殖腔部位的表皮層厚度沒有顯著的差異(Mann-Whitney U test, $U=8$, $Z=0.835$, $P=0.403$) (表四)，核質比也沒有顯著的不同(Mann-Whitney U test, $U=9$, $Z=-0.626$, $P=0.531$) (表四)(圖六)。

面天樹蛙不同部位的表皮組織

面天樹蛙於非繁殖季時身體部位之頭部、背部、腹部及泄殖腔的表皮層厚度並無顯著的差異(Kruskal-Wallis test, $H=6.146$, $P=0.1047$) (表七)，但是腹部的表皮層厚度為四個部位中最厚的。核質比也沒有顯著的不同(Kruskal-Wallis test, $H=0.180$, $P=0.980$) (表七)(圖四)。

面天樹蛙泄殖腔的部位

面天樹蛙於繁殖季與非繁殖季時泄殖腔部位之表皮層厚度有顯著的差異(Mann-Whitney U test, $U=3$, $Z=-2.769$, $P=0.005$)(表八), 但是核質比則沒有顯著的差異(Mann-Whitney U test, $U=14$, $Z=-1.407$, $P=0.140$)(表八)。

三、泌乳激素受體強度之差異

艾氏樹蛙與面天樹蛙之泌乳激素受體強度的標準詳見於圖二。依照染色強度將結果分為強度 0、強度 1、強度 2 及強度 3, 共四個等級。

艾氏樹蛙泌乳激素受體強度

於繁殖季和非繁殖季艾氏樹蛙之泄殖腔表皮層之泌乳激素受體強度有顯著的差異(Mann-Whitney U test, $U=8$, $Z=2.020$, $P=0.043$)(表五)(圖七), 繁殖季的顯著高於非繁殖季。繁殖季有撫育及沒有撫育之艾氏樹蛙泄殖腔部位的泌乳激素受體強度並無顯著的差異(Mann-Whitney U test, $U=3$, $Z=1.880$, $P=0.061$)(表六)(圖八), 有撫育及沒有撫育並沒有不同。

面天樹蛙泌乳激素受體強度

繁殖季和非繁殖季時面天樹蛙的泄殖腔表皮層之泌乳激素受體強度無顯著的差異(Mann-Whitney U test , $U=16$, $Z=1.608$, $P=0.107$) (表九)(圖九)。



討論

一、身體不同部位的表皮層厚度與其所扮演的功能

以結構來看，艾氏樹蛙(圖三)與面天樹蛙(圖四)的頭部、背部、腹部及泄殖腔部位的表皮結構與其他兩棲類動物的表皮構造類似。表皮組織由表皮層和真皮層所構成，真皮層有黏液腺體、顆粒腺體與黑色素細胞(Elias and Shapiro 1957, Blaylock et al. 1976, Brown et al. 1981, Fujikura et al. 1988, Els and Henneberg 1990, Goniakowska-Witalinska and Kubiczek 1998, Schwinger et al. 2001, de Brito-Gitirana and Azevedo 2005, Azevedo et al. 2006, Felseburgh et al. 2007, Rigolo 2008, Felseburgh et al. 2009, Jared et al. 2012)。

在厚度部分，艾氏樹蛙的頭部、背部、腹部及泄殖腔的表皮層厚度不一，表皮層厚度具有顯著的差異(表二)，顯示艾氏樹蛙不同部位的表皮結構可能扮演著不同的功能；面天樹蛙不同部位的表皮層厚度則沒有顯著差異(表七)。Lillywhite 等人(1997)的研究結果與本研究所發現不同部位之表皮層厚度上的差異結果相同，研究的物種同為樹蛙科的印度泛樹蛙(*Polypedates maculatus*)，表皮層厚度最薄的是頭部($22.5 \pm 2.6 \mu\text{m}$)，最厚是腹部($39.3 \pm 6.4 \mu\text{m}$)。前人亦探討同物種兩性之間的表皮結構，Jia 等人(2013) 研究東北林蛙(*Rana dybowskii*) 雌蛙與雄蛙的表皮結構差異，結果發現雌蛙背部表皮厚、雄蛙的腹部表皮

厚，推測兩性在抱接過程中表皮相互摩擦有利於受精過程的完成，他們認為這是適應生殖功能的結果。比較棲息於水中的非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*) 雌性與雄性個體在無水份(waterless)和一般有水份(normal)的環境條件之下，牠們背部與腹部表皮層厚度的改變，研究結果發現在無水份的環境中，雌、雄個體的背部與腹部的表皮層厚度都顯著比一般環境之下要來的薄，而且黏液腺體的所佔的面積也顯著的減少(Fujikura et al. 1988)。兩棲類不同部位的表皮構造扮演著不同的功能，具有形態上的差異與結構上的不同(de Brito-Gitirana and Azevedo 2005)，與他們所生存的環境有關(Fox 1994)。

艾氏樹蛙腹部表皮層厚度為四個部位中最厚的(表二)，而面天樹蛙不同部位表皮層厚度雖未有顯著差異，但腹部表皮層為四個部位中最厚(表七)，研究發現和前人研究結果相似，可能和滲透調節與水分的恆定有關(Toledo and Jared 1993)。Brown 等人(1981) 比較三種棲息於不同環境的物種的腹部表皮，物種包含了完全水域的非洲爪蟾(*X. laevis*)、介於水域與陸域的湖側褶蛙(*R. ridibunda*)以及主要為陸域的大蟾蜍(*B. bufo*)，表皮層厚度分別是 $129.5 \pm 6.3 \mu\text{m}$ 、 $56.9 \pm 3.4 \mu\text{m}$ 以及 $40.7 \pm 2.42 \mu\text{m}$ ，他們提出腹部表皮層增厚的原因是由於細胞層數的增加。本研究之艾氏樹蛙的腹部表皮層厚度則是 $24.41 \pm 4.12 \mu\text{m}$ ，接近棲息在陸域大蟾蜍(*B. bufo*)的表皮層厚度。Loveridge(1970)指出棲息

於非洲南部的大灰攀蛙(*Chiromantis xerampelina*)，腹部表皮吸收水分的速度比背部表皮要來的快，Nakashima and Kamishima(1990)研究日本樹蟾(*Hyla arborea japonica*)主要是藉由腹部表皮吸收水分，他們提出腹部表皮能減少水分的散失。觀察蟾蜍(*Rhinella ornate*)的組織切片可發現腹部骨盆腔(pelvic cavity)區域的海綿真皮層(spongy dermis)的結締組織相較於其他身體部位則較為鬆散，且血管較多，有助於水份的吸收(Felseburgh et al. 2009)。因此，兩棲類不同部位的表皮展現區域性的特化，以及形態學上的差異，這些差異和身體部位生理學有關(Felseburgh et al. 2007)，代表對棲地的適應(Felseburgh et al. 2009)，同時亦反映了物種的生活史(Fox 1994)。

二、繁殖與非繁殖季節的泄殖腔表皮層的構造改變

艾氏樹蛙的泄殖腔表皮層厚度在繁殖季顯著高於非繁殖季(表三)(圖五)，細胞核質比在繁殖季亦顯著較大於非繁殖季(表三)；而面天樹蛙表皮層厚度雖有顯著差異(表八)，但細胞核質比則無顯著差異(表八)。我認為艾氏樹蛙表皮層厚度與細胞核質比在季節上的改變是因為在繁殖季時個體的表皮結構處於增生與較為活躍的狀態，這同時也反映了細胞核質比例的增高。Greven and Richter (2009)研究負子蟾(*Pipa carvalhoi*)繁殖季和非繁殖季之雌蛙組織切片。非繁殖季雌蛙的

表皮層厚度為 30 μm 至 40 μm ，真皮層厚度為 250 μm 至 350 μm ；當繁殖期的雌蛙背部有受精卵著床時，表皮層變薄且形成卵的腔室，真皮層則增厚至 400 μm 至 600 μm ，因富含大量的膠原蛋白。此結果顯示非繁殖時期與繁殖時期的個體，其表皮結構的表皮層和真皮層會有形態上差異。由於負子蟾(*P. carvalhoi*)時常會面臨到相當乾旱的環境 (semi-arid environment)，當雨季來臨或出現短暫性的水體時，這種雌蟾將受精卵置於背上發育的親代照顧行為，有助於親代在環境良好時能夠有效的將子代放置於水體中(Fernandes et al. 2011)。除了兩棲類物種具有表皮結構上的改變之外，一種體外受精的魚類的表皮也具有親代撫育的功能，Buckley 等人(2010) 研究七彩神仙魚(*Symphysodon* spp.)的親代照顧，結果顯示在繁殖期間時幼魚對親代表皮的取食速率會顯著的增加，親魚的表皮會分泌含有氨基酸的黏液，此黏液可做為幼魚的養分來源，他們提出在繁殖期間的親代照顧和黏液的生理學，相似於哺乳動物和鳥類的親代照顧行為。

本研究結果中，繁殖季期間艾氏樹蛙雌蛙表皮層增厚，但相對的，面天樹蛙繁殖季的表皮層厚度也有增加，但是細胞核質比卻沒有改變，我推論這兩種物種表皮的差異可能和蝌蚪的乞食行為有關。林(1996)對艾氏樹蛙的行為研究中提到艾氏樹蛙雌蛙在能力所及的範圍內可以隨著蝌蚪數量的增加而增加產下的為受精卵數量。前人推測在這樣

乞食的行為之下且蝌蚪聚集啄咬雌蛙泄殖腔的附近的表皮(Ueda 1986, Kam and Yang 2002)，這種蝌蚪啄咬的外在刺激會導致個體表皮結構上的改變。Barni 等人(1987) 以組織切片與細胞學的方法研究義大利林蛙(*Rana esculenta* L.)在冬眠(hibernating)時期的表皮形態與表皮層細胞核的改變，研究結果發現冬眠時期表皮層的染色質濃縮的數量較少(less condensed chromatin)，而且 DNA 也大量減少，推測這樣緩慢的表皮組織分化(tissue differentiation)與細胞的更替(cell renewal kinetics)和此種林蛙冬眠行為有關。而本研究中，艾氏樹蛙的表皮層增厚可能是由於蝌蚪對於艾氏樹蛙雌蛙泄殖腔表皮的乞食行為，使得表皮結構上的改變與細胞核質比例的增高。

此外，艾氏樹蛙繁殖期個體的體重平均為 3.90 ± 1.02 克，非繁殖期的個體體重平均則是 3.61 ± 0.95 克(表一)，我推測繁殖期雌性個體的體重增加可能有一部分是由於卵巢、輸卵管、體內脂肪及卵發育的重量增加，即雌性的生殖器官開始為生殖及產卵做準備，且個人觀察的結果也發現繁殖季期間的雌蛙個體，腹部呈現脹大、脂肪體增多且體內卵子呈現成熟的黑白顏色。Tsiora and Kyriakopoulou-Sklavounou (2002)指出經由卵巢的重量改變與組織學上的切片結果可得知伊庇魯斯水蛙(*Rana epeirotica*)生殖週期呈現年間的變化，且卵巢的重量、卵子大小與個體的體重呈現正相關。此結果顯示繁殖期個體的體重會

增加是與體內生殖器官的重量增加有相關，與本研究結果相似。

三、有和沒有撫育雌蛙之泄殖腔表皮結構

艾氏樹蛙泄殖腔的表皮層厚度與核質比在有親代撫育與沒有親代撫育的個體中是沒有顯著差異的，此研究結果與過去前人的研究結果不同(表三)(圖六)。Wilkinson 等人(2008) 的研究發現，一種棲息於地底的環管蚓螈(*B. taitanus*)，具有特殊的親代撫育行為，雌蚓螈會用皮膚來餵養牠的子代，子代用特化的牙齒來剝掉並吃下雌蚓螈的皮膚最外層，經由組織切片發現親代撫育的雌性個體，其表皮層細胞的細胞質具有脂肪內涵物(lipid inclusions)，他們提出這樣表皮構造的改变為一種親代與子代的營養傳遞。Kupfer 等人(2008) 研究環管蚓螈(*B. taitanus*)有撫育的雌蚓螈其身體狀況與脂肪體比沒有撫育的雌蚓螈要來得差，而且有撫育的雌蚓螈身體狀況會隨著撫育時間而下降，顯示這樣的以皮膚餵食的親代撫育需要耗費雌性相當大的體能。del Pino 等人(1975) 研究里氏囊蛙(*G. riobambae*)背部放置受精卵的育兒袋(pouch)，育兒袋是依附於背部皮膚的囊袋結構，與一般兩棲類的皮膚相似，經由組織切片可發現，為複層鱗狀上皮(stratified squamous epithelium)，具有許多的黏液腺體，育兒袋具有血管和神經的繫帶連結於皮膚，在母蛙排卵之前，育兒袋的表皮層的上皮細胞凹陷形成許

多的皺摺，較少角質化，真皮層厚度增厚，且內部散布許多大的血管；蝌蚪出生之後，育兒袋會收縮且微血管退化，此結果顯示，在卵植入育兒袋中與蝌蚪自育兒袋孵化之後，都會產生表皮組織結構上的改變與重組，del Pino (1980)指出母體並未提供養分給胚胎，而是有其他的物質。Gomes 等人(2013)以圈養方式研究一種以皮膚餵食子代的蚓螈(*Siphonops annulatus*)並測量其生殖週期代謝與內分泌的變化，測量雌性的肝臟、卵巢及皮膚的組織總脂肪量，結果發現與其他季節相比之下，冬天繁殖季節時的卵巢及皮膚的組織總脂肪量是最高的，他們提出皮膚脂肪會受到卵黃生成(vitellogenic)的強化，從脂肪體轉移作為準備皮膚餵食，結果顯示繁殖期間的個體會受到內分泌的影響。

由此可知，上述的物種在有和沒有撫育的個體是具有表皮結構上的差異，與本研究的結果不同。本研究中艾氏樹蛙有親代有和無親代撫育的泄殖腔表皮厚度和核質比並沒有顯著的不同。我推測艾氏樹蛙雌蛙在繁殖季期間，個體便進入準備撫育的狀態，在這期間無論個體是否有餵食未受精卵供子代食用，只要為繁殖期間的個體，其表皮結構皆會增厚，因此細胞核質亦會增高。

四、繁殖與非繁殖季節泄殖腔表皮層的泌乳激素受體強度的改變

本研究的結果發現，艾氏樹蛙在繁殖季的泌乳激素受體強度顯

著大於非繁殖季(表五)(圖七)；而沒有親代照顧行為的面天樹蛙則沒有顯著差異(表九)(圖九)。泌乳激素受體強度在艾氏樹蛙繁殖季期間增加，推測這可能與雌蛙的餵食行為有關。過去文獻指出，在硬骨魚類中泌乳激素具有廣泛調節的功能，包含了滲透調節、免疫調節、生長發育及生殖行為等，例如成魚的腎、肺和腸等組織，具有較高濃度的泌乳激素受體表現量，這些組織為硬骨魚滲透調節器官(Suzuki et al. 2003)。此外，研究具有親代照顧行為的黃盤棕麗魚(*S. aequifasciata*)，雌性個體的泌乳激素的表現量和親代照顧有關。比較有親代照顧和沒有親代照顧行為雌魚個體的泌乳激素 mRNA 表現量(relative mRNA level)，結果顯示具有親代照顧行為者顯著有較高泌乳激素受體表現量(Khong et al 2009)。

在兩棲類中，泌乳激素的功能包含了水分及電解質的平衡、亦影響個體的生長和發育及生殖行為(Clarke and Bern 1980, Mosconi et al. 1994, Bole-Feysot et al 1998, Foitzik et al 2009)。Mosconi 等人(2002)研究環境溫度的改變對雌性義大利蠃螈(*Triturus carnifex Laur*)泌乳激素分泌及生殖行為的影響，於二月的繁殖期間自野外捕捉個體，隨後將個體分別置於模擬繁殖期的池塘溫度(4°C)與非繁殖期的溫度(18°C)一個月，研究結果發現繁殖期個體的腦垂體泌乳激素 mRNA(pituitary PRL mRNA)、血漿泌乳激素(plasma PRL)、卵黃蛋白原(vitellogenin，

VTG)及雌二醇(estradiol-17 β)都顯著比非繁殖季個體要來的高。此結果顯示，環境的溫度會改變雌性蠓蟻的泌乳激素濃度與其生殖行為表現。Inceli 等人(2010) 研究泌乳激素受體分布湖側褶蛙(*R. ridibunda*) 皮膚的分布的位置，經由組織切片與免疫組織化學染色的結果發現，腹部與背部皮膚的表皮層皆有泌乳激素受體，但是背部皮膚的最外層角質層並沒有偵測到泌乳激素受體；提出背部皮膚比腹部皮膚更多的泌乳激素受體，是為滲透調節的結果。

五、有和沒有撫育雌蛙之泄殖腔表皮層泌乳激素受體強度

在有和沒有撫育的艾氏樹蛙泌乳激素受體強度是沒有顯著差異(表六)(圖八)。結果也發現，繁殖季節有和沒有撫育的泌乳激素受體強度皆是高於非繁殖季的強度，推測進入繁殖季節個體的表皮的泌乳激素都會增高，無論在有撫育或沒有撫育的狀態下，個體可能受到體內內分泌的改變與影響，因此可以偵測到表皮含有較高強度的泌乳激素受體。泌乳激素已被視為親子關係的賀爾蒙(hormone of paternity)(Schradin and Anzenberger, 1999)，許多的鳥類、哺乳類和魚類都顯示親代照顧行為和泌乳激素濃度呈現正相關。在脊椎動物中，泌乳激素的功能與上皮細胞的增生有直接的關係(Sakamoto et al., 2005)，即泌乳激素會促進上皮細胞的增生。前人以組織學觀察結果

顯示以表皮餵食子代的七彩神仙魚(*Smphysodon discus*)的表皮層具是由大量且體積大的黏液細胞所組成(Hilenmann 1959)；雖然幼魚對親魚表皮的啄咬與親魚的產生大量的黏液分泌，都會造成親魚病理感染的風險增加，但是上皮黏液細胞的增生和黏液的分泌可能具有防止病原體入侵的好處(Khong et al. 2009)，此外，魚類的表皮黏液包含大量免疫相關的蛋白質，例如免疫球蛋白、蛋白水解酵素、和許多其他抗菌蛋白及胜肽(Khong et al. 2009, Suzuki et al. 2003, Subramanian et al. 2007)。

表皮結構的改變與泌乳激素的影響已在蝶螈的研究中被提及，(Singhas and Ward 1993)。亦有研究指出泌乳激素也會促使蝶螈從棲息地遷移至繁殖地(Moriya 1982)，可能為一種刺激個體繁殖遷移的必要賀爾蒙。Hoffman and Dent(1978)研究火焰蝶螈(*Notophthalmus viridescens viridescens*)的黏液腺體(mucus gland)的形態與泌乳激素的關係，結果顯示泌乳激素會降低腺體的體積。另外，泌乳激素也會改變火焰蝶螈(*N. viridescens*)的表皮紋理(texture)與表皮分泌的活性(Singhas and Ward 1993, Pelli et al. 2010)，其中包含了表皮醣類接合劑(epidermal glycoconjugates)的分布與結構上的表現，表皮醣類接合劑具有滲透調節、激素的結合、保護細胞免於病原體入侵或是防止脫水或是離子傳輸的功能。同時，當注射外源性的泌乳激素之後，表皮醣

類接合劑，例如岩藻糖(fucose)、半乳糖(galactose)、乙醯半乳糖(n-acetylgalactosamine)都會下降。由上述研究可知，泌乳激素對兩棲類的表皮結構扮演著滲透調節或是生殖加上的角色；然而，本研究中對於泌乳激素是否直接參與艾氏樹蛙表皮結構的生理過程，還需要再更進一步的研究。

六、艾氏和面天樹蛙的表皮構造與泌乳激素受體強度

艾氏和面天樹蛙的表皮層厚度都有變化，即繁殖季的個體和非繁殖季的個體都有表皮層厚度的改變；但在細胞核質比方面，艾氏樹蛙有顯著差異，然而面天樹蛙卻沒有變化，推測艾氏樹蛙的表皮層細胞核質比處於活躍狀態。因此，我推論這兩種物種表皮的差異，可能與蝌蚪的乞食行為有關。相同的，泌乳激素受體的強度在艾氏樹蛙繁殖與非繁殖季有顯著差異，但面天樹蛙則沒有差異，推測泌乳激素受體可能對艾氏樹蛙扮演親代照顧的角色。Boos 等人(2007) 研究雌性綠頭鴨(*Anas platyrhynchos*)親代照顧行為和血液中泌乳激素濃度(plasma prolactin concentrations)的相關性，研究結果顯示，在窩卵成熟時，泌乳激素仍然是高濃度的狀態，但是在窩卵孵化後的六週，泌乳激素濃度便會下降，作者提出這樣的現象可以使子代從卵到幼體期間得到完整的照顧。

總結

1. 艾氏樹蛙與面天樹蛙的表皮構造與其他兩棲類的構造相似，由表皮層與真皮層構成。
2. 兩種物種中，腹部的表皮層皆為身體部位中最厚的，腹部視為蛙類維持水分與身體滲透恆定的重要部位。
3. 艾氏樹蛙的泄殖腔部位的表皮層厚度與細胞核質比在繁殖與非繁殖季節上有顯著的差異，推測在繁殖季時表皮結構處於增生與活躍的狀態。
4. 有撫育和沒有撫育的艾氏樹蛙之泄殖腔部位的表皮層厚度與細胞核質比並沒有差異，與預期結果相反也和前人研究結果不同。推測在繁殖狀態的個體表皮結構皆會增厚，此目的是個體為了繁殖所形成的結構上的改變。
5. 艾氏樹蛙於繁殖季的泌乳激素受體強度顯著大於非繁殖季，沒有親代照顧的面天樹蛙則沒有顯著差異，推測艾氏樹蛙泌乳激素的增強可能與雌蛙的餵食行為有關。

參考文獻

- Abràmoff, M. D., P. J. Magalhães, and S. J. Ram. 2004. Image processing with Image J. *Biophotonics international* **11**:36-43.
- Azevedo, R. A., A. S. de Jesus Santana, and L. de Brito-Gitirana. 2006. Dermal collagen organization in *Bufo ictericus* and in *Rana catesbeiana* integument (Anuran, Amphibian) under the evaluation of laser confocal microscopy. *Micron* **37**:223-228
- Barbeau, T. R. and H. B. Lillywhite. 2005. Body wiping behaviors associated with cutaneous lipids in hylid tree frogs of Florida. *Journal of Experimental Biology* **208**:2147-2156.
- Barni, S., G. Bernocchi, and G. Gerzeli. 1987. Nuclear changes and morphology of the epidermis in the hibernating frog. *Tissue and Cell* **19**:817-825.
- Bender, N., M. Taborsky, and D. M. Power. 2008. The role of prolactin in the regulation of brood care in the cooperatively breeding fish *Neolamprologus pulcher*. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology* **309**:515-524.
- Blüm, V. and K. Fiedler. 1965. Hormonal control of reproductive behavior in some cichlid fish. *General and Comparative Endocrinology* **5**:186-196.
- Blaylock, L. A., R. Ruibal, and K. Platt-Aloia. 1976. Skin structure and wiping behavior of phyllomedusine frogs. *Copeia* **1976**:283-295.
- Bole-Feysot, C., V. Goffin, M. Edery, N. Binart, and P. A. Kelly. 1998. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocrine Reviews* **19**:225-268.
- Boos, M., C. Zimmer, A. Carriere, J.-P. Robin, and O. Petit. 2007. Post-hatching parental care behaviour and hormonal status in a precocial bird. *Behavioural processes* **76**:206-214.

- Brown, D., A. Grosso, and R. De Sousa. 1981. The amphibian epidermis: distribution of mitochondria-rich cells and the effect of oxytocin. *Journal of Cell Science* **52**:197-213.
- Brown, J. L., V. Morales, and K. Summers. 2010. A key ecological trait drove the evolution of biparental care and monogamy in an amphibian. *The American Naturalist* **175**:436-446.
- Brown, S. C., P. S. Brown, K. Yamamoto, K. Matsuda, and S. Kikuyama. 1991. Amphibian prolactins: activity in the eft skin transepithelial potential bioassay. *General and comparative endocrinology* **82**:1-7.
- Buckley, J., R. J. Maunder, A. Foey, J. Pearce, A. L. Val, and K. A. Sloman. 2010. Biparental mucus feeding: a unique example of parental care in an Amazonian cichlid. *The Journal of Experimental Biology* **213**:3787-3795.
- Buntin, J. D., G. M. Becker, and E. Ruzycki. 1991. Facilitation of parental behavior in ring doves by systemic or intracranial injections of prolactin. *Hormones and Behavior* **25**:424-444.
- Clark, B. T. 1997. The natural history of amphibian skin secretions, their normal functioning and potential medical applications. *Biological Reviews* **72**:365-379.
- Clarke, W. C. and H. A. Bern. 1980. Comparative endocrinology of prolactin. Pages 105-197 in C.-H. Li, editor. *Hormonal proteins and peptides*. Academic Press, New York.
- Clutton-Brock, T. H. 1991. *The evolution of parental care*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey.
- Crump, M. 1995. Parental care. Pages 518-567 in H. Heatwole and B. K. Sullivan, editors. *Amphibian biology*. Vol. 2. Social behaviour. Surrey Beatty and Sons Chipping Norton, New South Wales.
- de Brito-Gitirana, L. and R. A. Azevedo. 2005. Morphology of *Bufo ictericus* integument (Amphibia, Bufonidae). *Micron* **36**:532-538.

- del Pino, E. M. 1980. Morphology of the pouch and incubatory integument in marsupial frogs (Hylidae). *Copeia* **1980**:10-17.
- del Pino, E. M., M. L. Galarza, C. M. de Albuja, and A. Humphries. 1975. The maternal pouch and development in the marsupial frog *Gastrotheca riobambae* (Fowler). *The Biological Bulletin* **149**:480-491.
- D'Istria, M., A. Picilli, C. Basile, G. Delrio, and G. Chieffi. 1982. Morphological and biochemical variations in the skin of *Rana esculenta* during the annual cycle. *General and Comparative Endocrinology* **48**:20-24.
- Drago, F., B. Bohus, P. L. Canonico, and U. Scapagnini. 1981. Prolactin induces grooming in the rat: possible involvement of nigrostriatal dopaminergic system. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **15**:61-63.
- Duellman, W. R. and L. Trueb. 1994. *Biology of Amphibians*. Johns Hopkins University Press, Baltimore and London.
- Elias, H. and J. Shapiro. 1957. Histology of the skin of some toads and frogs. *American Museum Novitates* **1819**:1-27.
- Els, W. J. and R. Henneberg. 1990. Histological features and histochemistry of the mucous glands in ventral skin of the frog (*Rana fuscigula*). *Histology and Histopathology* **5**:343-348.
- Elzagheid, A., A. Algars, R. Bendardaf, H. Lamlum, R. Ristamaki, Y. Collan, K. Syrjanen, and S. Pyrhonen. 2006. E-cadherin expression pattern in primary colorectal carcinomas and their metastases reflects disease outcome. *World Journal of Gastroenterology* **12**:4304-4309.
- Farquhar, M. G. and G. E. Palade. 1964. Functional organization of amphibian skin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **51**:569-577.

- Felsemburgh, F. A., S. P. Carvalho-e-Silva, and L. d. Brito-Gitirana. 2007. Morphological characterization of the anuran integument of the *Proceratophrys* and *Odontophrynus* genera (Amphibia, Anuran, Leptodactylidae). *Micron* **38**:439-445.
- Felsemburgh, F. A., P. G. de Almeida, S. P. de Carvalho-e-Silva, and L. de Brito-Gitirana. 2009. Microscopical methods promote the understanding of the integument biology of *Rhinella ornata*. *Micron* **40**:198-205.
- Fernandes, T. L., M. M. Antoniazzi, E. Sasso-Cerri, M. I. Egami, C. Lima, M. T. Rodrigues, and C. Jared. 2011. Carrying progeny on the back: reproduction in the Brazilian aquatic frog *Pipa carvalhoi*. *South American Journal of Herpetology* **6**:161-176.
- Foitzik, K., E. A. Langan, and R. Paus. 2009. Prolactin and the skin: a dermatological perspective on an ancient pleiotropic peptide hormone. *Journal of Investigative Dermatology* **129**:1071-1087.
- Fox, H. 1994. The structure of the integument. Page 1-32 in H. Heatwole and G. T. Barthalmus editors. *Amphibian Biology Vol. 1. The Integument*. Chipping Norton, New South Wales, Australia, Surrey Beatty and Sons.
- Fujikura, K., S. Kurabuchi, M. Tacubhi, and S. Inoue. 1988. Morphology and distribution of the skin glands in *Xenopus laevis* and their response to experimental stimulations. *Zoological Science* **5**:415-430.
- Geise, W. and K. E. Linsenmair. 1986. Adaptations of the reed frog *Hyperolius viridiflavus* (Amphibia, anura, Hyperoliidae) to its arid environment. *Oecologia* **68**:542-548.
- Geise, W. and K. E. Linsenmair. 1988. Adaptations of the reed frog *Hyperolius viridiflavus* (Amphibia, Anura, Hyperoliidae) to its arid environment. *Oecologia* **77**:327-338.
- Goniakowska-Witalinska, L. and U. Kubiczek. 1998. The structure of the

- skin of the tree frog (*Hyla arborea arborea* L.). *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger* **180**:237-246.
- Gomes, A. D., C. A. Navas, C. Jared, M. M. Antoniazzi, N. R. Ceballos, and R. G. Moreira. 2013. Metabolic and endocrine changes during the reproductive cycle of dermatophagic caecilians in captivity. *Zoology* **116**:277-285.
- Greven, H., Z. Klaus, and G. Schwinger. 1995. Mechanical properties of the skin of *Xenopus laevis* (Anura, Amphibia). *Journal of Morphology* **224**:15-22.
- Greven, H. and S. Richter. 2009. Morphology of skin incubation in *Pipa carvalhoi* (Anura: Pipidae). *Journal of Morphology* **270**:1311-1319.
- Hildemann, W. 1959. A cichlid fish, *Symphysodon discus*, with unique nurture habits. *American Naturalist* **93**:27-34.
- Houck, L. D. and D. M. Sever. 1994. Role of the skin in reproduction and behaviour. Page 351-381 in H. Heatwole and G. T. Barthalmus editors. *Amphibian Biology Vol1. The Integument*. Chipping Norton, New South Wales, Australia, Surrey Beatty and Sons.
- Hoffman, C. W. and J. N. Dent. 1978. The morphology of the mucous gland and its responses to prolactin in the skin of the red-spotted newt. *Journal of Morphology* **157**:79-97.
- Inceli, M. S., E. Kaptan, S. Sancar, O. Murathanoglu, and S. S. Castillo. 2010. Localization of prolactin receptor in the dorsal and ventral skin of the frog (*Rana ridibunda*). *Biologia* **65**:157-163.
- Ingram, G. J., M. Anstis, and C. Corben. 1975. Observations on the Australian leptodactylid frog, *Assa darlingtoni*. *Herpetologica* **31**:425-429.
- Janik, D. and J. Buntin. 1985. Behavioural and physiological effects of prolactin in incubating ring doves. *Journal of Endocrinology* **105**:201-209.

- Jared, S. R., J. P. Rao, and K. Indirani. 2012 A study of intercalated / light cells of dorsal skin in south Indian frog *Rana hexadactyla* with light and electron microscope. International Journal of Basic and Applied Medical Sciences **2**:8-13.
- Jia, L., C. Tian, and S. Li. 2013. Comparative histological observation of skin in male and female frog (*Rana dybowskii*) during breeding season. Chinese Agricultural Science Bulletin **2**:23-26.
- Jungfer, K.-H. 1996. Reproduction and parental care of the coronated treefrog, *Anothea spinosa* (Steindachner, 1864)(Anura: Hylidae). Herpetologica **52**:25-32.
- 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.
- 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., 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. and H.-W. Yang. 2002. Female-offspring communication in a Taiwanese tree frog, *Chirixalus eiffingeri* (Anura: Rhacophoridae). Animal Behaviour **64**:881-886.
- Khong, H.-K., M.-K. Kuah, A. Jaya-Ram, and A. C. Shu-Chien. 2009. Prolactin receptor mRNA is upregulated in discus fish (*Symphysodon aequifasciata*) skin during parental phase. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology **153**:18-28.

- Kikuyama, S. and F. Toyoda. 1999. Sodefrin: a novel sex pheromone in a newt. *Reviews of Reproduction* **4**:1-4.
- Kobelt, F. and K. Linsenmair. 1986. Adaptations of the reed frog *Hyperolius viridiflavus* (Amphibia, Anura, Hyperoliidae) to its arid environment. *Oecologia* **68**:533-541.
- Kupfer, A., H. Müller, M. M. Antoniazzi, C. Jared, H. Greven, R. A. Nussbaum, and M. Wilkinson. 2006. Parental investment by skin feeding in a caecilian amphibian. *Nature* **440**:926-929.
- Kupfer, A., M. Wilkinson, D. J. Gower, H. Muller, and R. Jehle. 2008. Care and parentage in a skin-feeding caecilian Amphibian. *Journal of experimental zoology* **309A**:460-467.
- Lam, T. and W. Hoar. 1967. Seasonal effects of prolactin on freshwater osmoregulation of the marine form (trachurus) of the stickleback *Gasterosteus aculeatus*. *Canadian Journal of Zoology* **45**:509-516.
- Linzey, D. W. 2012. *Vertebrate biology*. Johns Hopkins University Press, McGraw Hill, New York.
- Li, K.-W., D.-N. Lee, W.-T. Huang, and C.-F. Weng. 2006. Temperature and humidity alter prolactin receptor expression in the skin of toad (*Bufo bankorensis* and *Bufo melanostictus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* **145**:509-516.
- Lillywhite, H., A. Mittal, T. Garg, and N. Agrawal. 1997. Integumentary structure and its relationship to wiping behaviour in the common Indian tree frog, *Polypedates maculatus*. *Journal of Zoology* **243**:675-687.
- Loveridge, J. 1970. Observations on nitrogenous excretion and water relations of *Chiromantis xerampelina* (Amphibia, Anura). *Arnoldia* **5**:1-6.
- Linsenmair, K., M. Rosenberg, and M. Warburg. 1999. Unusual cell

- ultrastructure in ventral epidermis of the African reed frog *Hyperolius viridiflavus*, (Anura; Hyperoliidae). *Anatomy and Embryology* **200**:607-614.
- Moriya, T. 1982. Prolactin induces increase in the specific gravity of salamander, *Hynobius retardatus*, that raises adaptability to water. *Journal of experimental zoology* **223**:83-88.
- Mosconi, G., M. Cardinali, K. Yamamoto, S. Kikuyama, C. Vellano, and A. M. Polzonetti-Magni. 2002. Temperature-dependent prolactin secretion and reproductive biology of the newt *Triturus carnifex* Laur. *General and Comparative Endocrinology* **126**:261-268.
- Mosconi, G., K. Yamamoto, O. Carnevali, M. Nabissi, A. Polzonetti-Magni, and S. Kikuyama. 1994. Seasonal changes in plasma growth hormone and prolactin concentrations of the frog *Rana esculenta*. *General and Comparative Endocrinology* **93**:380-387.
- Nakashima, H. and Y. Kamishima. 1990. Regulation of water permeability of the skin of the treefrog, *Hyla arborea japonica*: physiology. *Zoological Science* **7**:371-376.
- Norris, D. O., H. B. Austin, and A. S. Huazi. 1989. Induction of cloacal and dermal skin glands of tiger salamander larvae, (*Ambystoma tigrinum*): effects of testosterone and prolactin. *General and Comparative Endocrinology* **73**:194-204.
- Parakkal, P. F. and A. G. Matoltsy. 1964. A study of the fine structure of the epidermis of *Rana pipiens*. *The Journal of Cell Biology* **20**:85-94.
- Pelli, A. A., L. P. Cinelli, P. A. S. Mourao, and L. de Brito-Gitirana. 2010. Glycosaminoglycans and glycoconjugates in the adult anuran integument (*Lithobates catesbeianus*). *Micron* **41**:660-665.
- Rigolo, J. R., Almeida J.A. and Ananias F. 2008. Histochemistry of skin glands of *Trachycephalus aff. venulosus* Laurenti, 1768 (Anura,

Hylidae). *Micron* **39**:56-60.

Sakamoto, T., A. Oda, K. Narita, H. Takahashi, T. Oda, J. Fujiwara, and W. Godo. 2005. Prolactin: fishy tales of its primary regulator and function. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1040**:184-188.

Schradin, C. and G. Anzenberger. 1999. Prolactin, the hormone of paternity. *Physiology* **14**:223-231.

Schwinger, G., K. Zanger, and H. Greven. 2001. Structural and mechanical aspects of the skin of *Bufo marinus* (Anura, Amphibia). *Tissue and Cell* **33**:541-547.

Singhas, C. A. and D. L. Ward. 1993. Prolactin alters the expression of integumental glycoconjugates in the red spotted newt, *Notophthalmus viridescens*. *The Anatomical Record* **236**:537-546.

Stevens, A. and J. S. Lowe. 2005. *Human histology* (3rd edition). Elsevier Limited.

Subramanian, S., S.L. MacKinnon, N.W. Ross. 2007. A comparative study on innate immune parameters in the epidermal mucus of various fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **148**:256–263.

Suzuki, Y., S. Tasumi, S. Tsutsui, M. Okamoto, and H. Suetake. 2003. Molecular diversity of skin mucus lectins in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **136**:723-730.

Tsiora, A. and P. Kyriakopoulou-Sklavounou. 2002. Female reproductive cycle of the water frog *Rana epeirotica* in northwestern Greece. *Amphibia-Reptilia* **23**:269-280.

Toledo, R. and C. Jared. 1993. Cutaneous adaptations to water balance in amphibians. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*. **105**:593-608.

- Ueda, H. 1986. Reproduction of *Chirixalus eiffingeri* (Boettger).
Scientific Reports of Laboratory for Amphibian Biology,
Hiroshima University **8**:109-116.
- Watanabe, S., K. Okita, T. Harada, T. Kodama, Y. Numa, T. Takemoto and
T. Takahashi. 1983. Morphologic studies of the liver cell
dysplasia. *Cancer* **51**:2197-2205.
- Wells, K. D. 1981. Parental behavior of male and female frogs. Pages
184-197 in R. D. Alexander and D. W. Tinkle, editors. *Natural
Selection and Social Behavior: Recent Research and New Theory*.
Chiron Press, New York.
- Weygoldt, P. 1980. Complex brood care and reproductive behaviour in
captive poison-arrow frogs, *Dendrobates pumilio* O. Schmidt.
Behavioral Ecology and Sociobiology **7**:329-332.
- Whittington, C. M. and A. B. Wilson. 2013. The role of prolactin in fish
reproduction. *General and Comparative Endocrinology*
191:123-136.
- Wilkinson, M., A. Kupfer, R. Marques-Porto, H. Jeffkins, M. M.
Antoniuzzi, and C. Jared. 2008. One hundred million years of skin
feeding ? Extended parental care in a Neotropical caecilian
(Amphibia: Gymnophiona). *Biology Letters* **4**:358-361
- 林春富。1996。艾氏樹蛙母蛙的生殖投資與其蝌蚪的族群生態學。國

立台灣大學碩士論文。

表一、艾氏樹蛙(*Kurixalus eiffingeri*)與面天樹蛙(*Kurixalus idiotocus*)於繁殖(Breeding season)及非繁殖季節(Non-breeding season)時的樣本資料。

Species	<i>Kurixalus eiffingeri</i>	<i>Kurixalus eiffingeri</i>	<i>Kurixalus idiotocus</i>	<i>Kurixalus idiotocus</i>
Status	Breeding season	Non-breeding season	Breeding season	Non-breeding season
Sampling number	10	5	12	6
SVL(mm)	36.75±3.33	35.72±3.30	34.96±1.79	33.69±1.94
Weight (g)	3.90±1.02	3.61±0.95	2.54±0.59	1.98±0.31

每組資料以 mean±SD 表示。

表二、非繁殖季節艾氏樹蛙身體各部位(Body region)之頭部(Head)、背部(Dorsal)、腹部(Ventral)及泄殖腔(Cloacal)的表皮層厚度(Thickness)與核質比(N:C ratio)。

Body region	n	Thickness(μm)	N:C ratio
Head	5	14.40 \pm 2.60 ^a	0.25 \pm 0.02 ^a
Dorsal	5	21.29 \pm 6.68 ^{ab}	0.32 \pm 0.10 ^a
Ventral	5	24.41 \pm 4.12 ^b	0.28 \pm 0.06 ^a
Cloacal	5	19.49 \pm 2.45 ^{ab}	0.26 \pm 0.05 ^a

a、b 代表組間的結果，在不同部位的厚度與核質比的數值若有標上相同的字母則表示之間沒有顯著差異。

每組資料以 mean \pm SD 表示。

表三、繁殖(Breeding)與非繁殖季節(Non-breeding)的艾氏樹蛙泄殖腔部位之表皮層厚度(Thickness)與核質比(N:C ratio)。

Condition	n	Thickness(μm)	N:C ratio
Breeding	10	30.81 \pm 8.19	0.38 \pm 0.12
Non-breeding	5	19.49 \pm 2.45	0.26 \pm 0.05

每組資料以 mean \pm SD 表示。

表四、繁殖季節有撫育(Nesting)和沒有撫育(Non-nesting)之艾氏樹蛙泄殖腔部位的表皮層厚度(Thickness)與核質比(N:C ratio)。

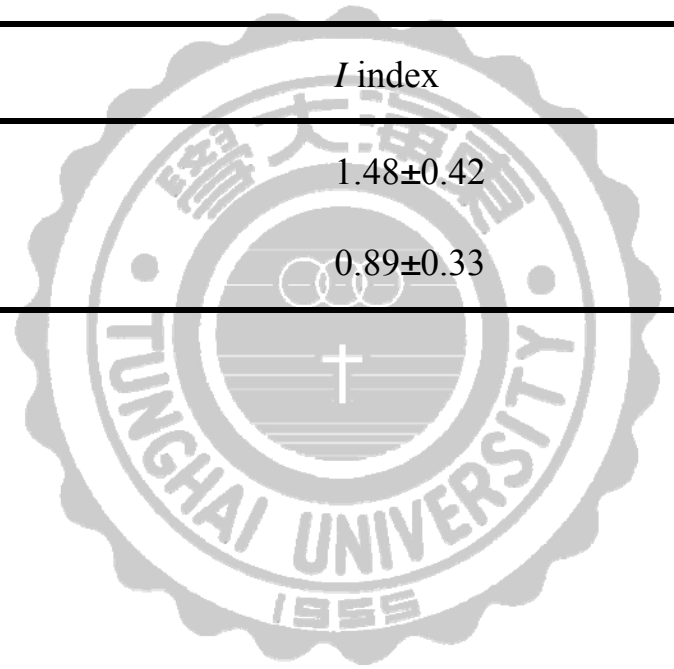
Condition	n	Thickness(μm)	N:C ratio
Nesting	5	32.71 \pm 10.08	0.39 \pm 0.13
Non-nesting	5	28.93 \pm 6.36	0.36 \pm 0.13

每組資料以 mean \pm SD 表示。

表五、繁殖(Breeding)與非繁殖季節(Non-breeding)的艾氏樹蛙泄殖腔表皮層之泌乳激素受體強度(Prolactin receptor intensity, *I* index)。

Condition	n	<i>I</i> index
Breeding	10	1.48±0.42
Non-breeding	5	0.89±0.33

每組資料以 mean±SD 表示。



表六、繁殖季節有撫育(Nesting)和沒有撫育(Non-nesting)之艾氏樹蛙泄殖腔部位的泌乳激素受體強度(Prolactin receptor intensity, *I* index)。

Condition	n	<i>I</i> index
Nesting	5	1.82±0.39
Non-nesting	5	1.13±0.44

每組資料以 mean±SD 表示。

表七、非繁殖季節面天樹蛙身體各部位(Body region)之頭部(Head)、背部(Dorsal)、腹部(Ventral)及泄殖腔(Cloacal)的表皮層厚度(Thickness)與核質比(N:C ratio)。

Body region	n	Thickness(μm)	N:C ratio
Head	6	7.71 \pm 2.07 ^a	0.25 \pm 0.04 ^a
Dorsal	6	5.93 \pm 1.64 ^a	0.26 \pm 0.12 ^a
Ventral	6	9.19 \pm 4.66 ^a	0.27 \pm 0.02 ^a
Cloacal	6	8.80 \pm 2.83 ^a	0.25 \pm 0.07 ^a

不同部位的厚度與核質比的數值標上相同的字母則表示之間沒有顯著差異。

每組資料以 mean \pm SD 表示。

表八、繁殖(Breeding)與非繁殖季節(Non-breeding)的面天樹蛙泄殖腔部位之表皮層厚度(thickness)與核質比(N:C ratio)。

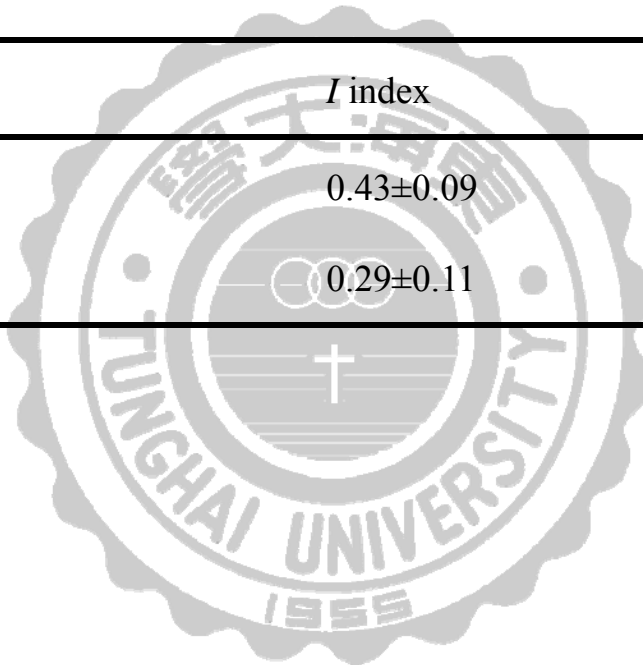
Condition	n	Thickness(μm)	N:C ratio
Breeding	12	16.25 \pm 4.85	0.32 \pm 0.06
Non-breeding	6	8.80 \pm 2.83	0.25 \pm 0.07

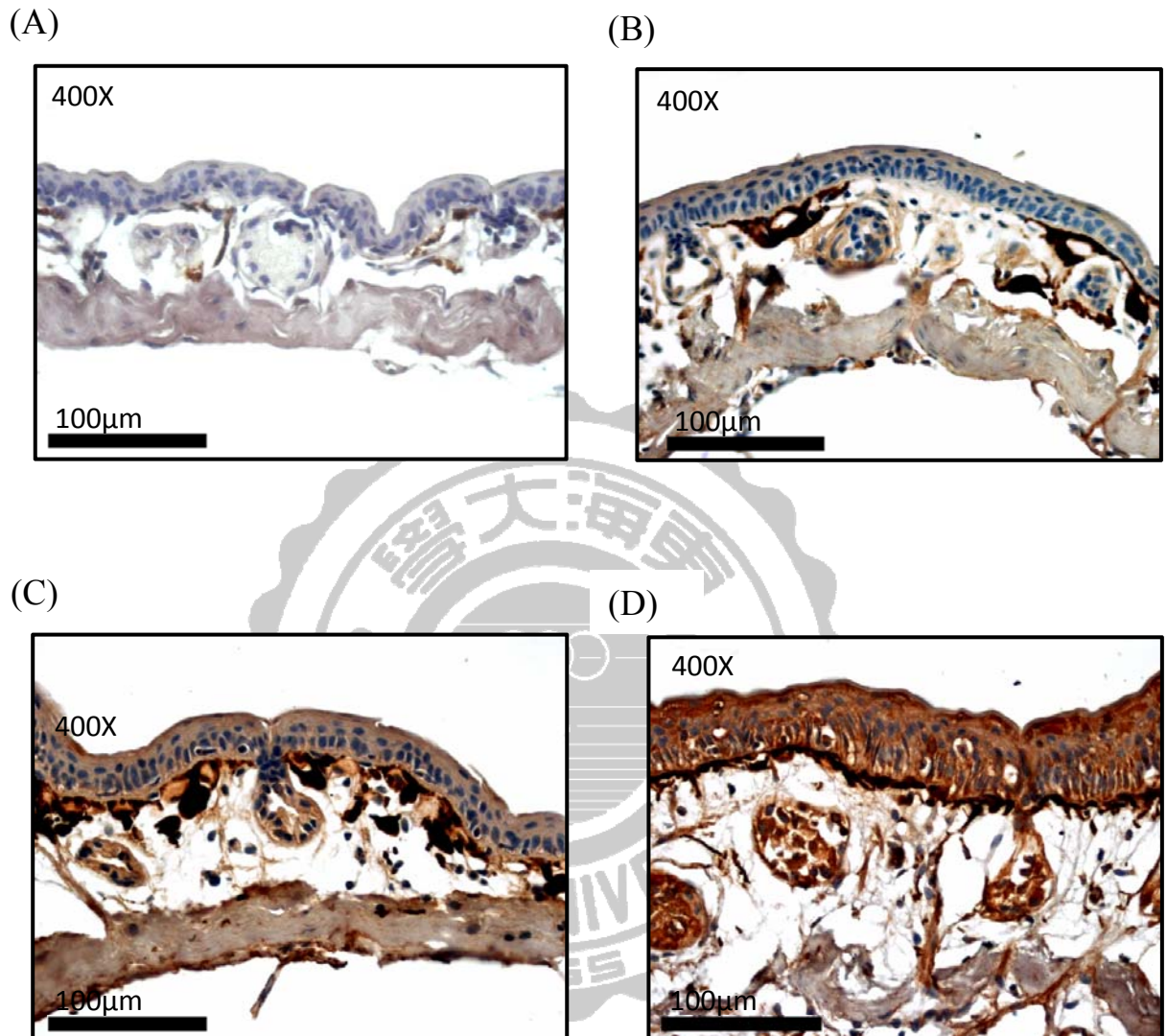
每組資料以 mean \pm SD 表示。

表九、繁殖(Breeding)與非繁殖季節(Non-breeding)的面天樹蛙泄殖腔表皮層之泌乳激素受體強度(Prolactin receptor intensity, *I* index)。

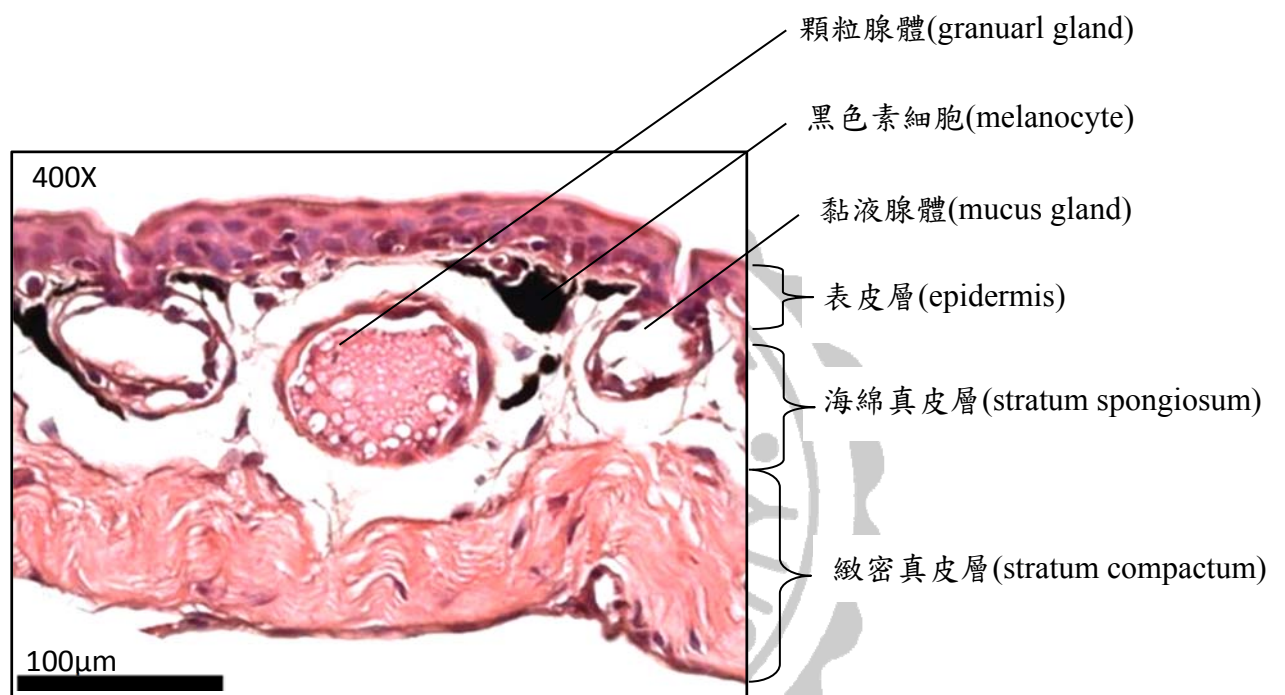
Condition	N	<i>I</i> index
Breeding	12	0.43±0.09
Non-breeding	6	0.29±0.11

每組資料以 mean±SD 表示。



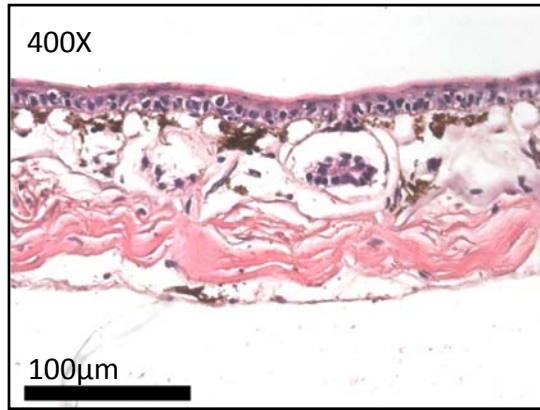


圖一、免疫組織化學之泌乳激素受體(prolactin receptor, PRLR)染色的強度(*I* intensity)標準。(A)強度 0、(B)強度 1、(C)強度 2 以及(D)強度 3。400X 代表倍率，比例尺等於 100 µm。

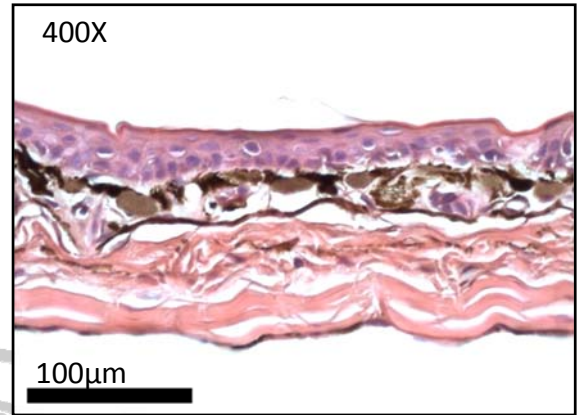


圖二、組織化學之蘇木紫-伊紅染色 (hematoxylin and eosin stain, H&E stain) 之染色結果與表皮構造說明。400X 代表倍率，比例尺等於 100 µm。

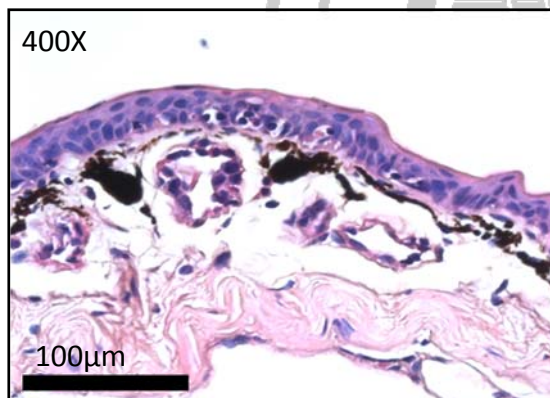
(A)



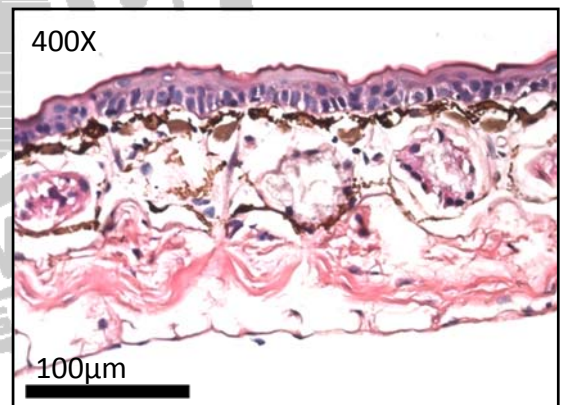
(B)



(C)

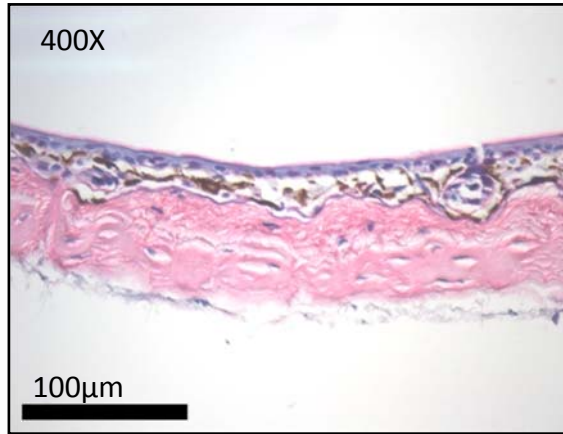


(D)

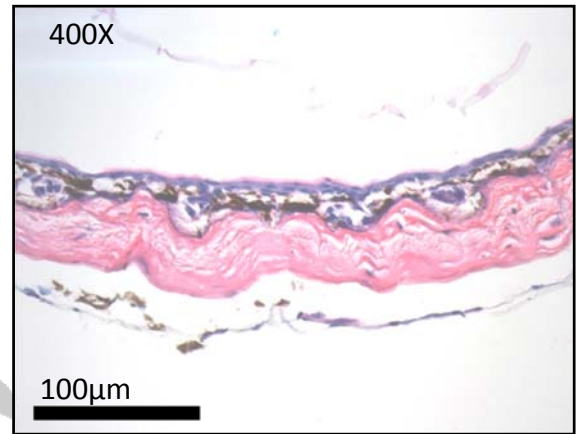


圖三、非繁殖季節艾氏樹蛙身體各部位的表皮構造切片圖，以蘇木紫-伊紅染色(hematoxylin and eosin stain, H&E stain)，(A)：頭部、(B)：背部、(C)：腹部、(D)：泄殖腔。400X 代表倍率，比例尺等於 100 µm。

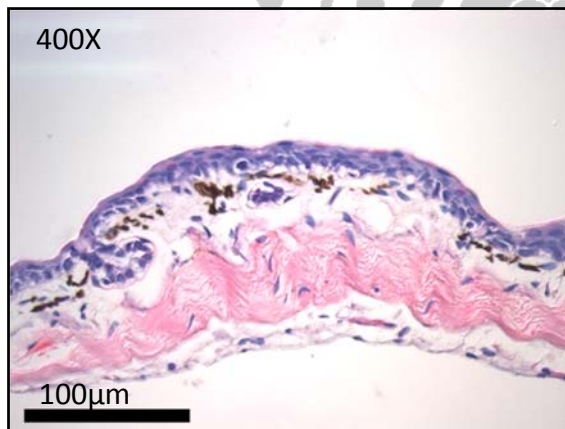
(A)



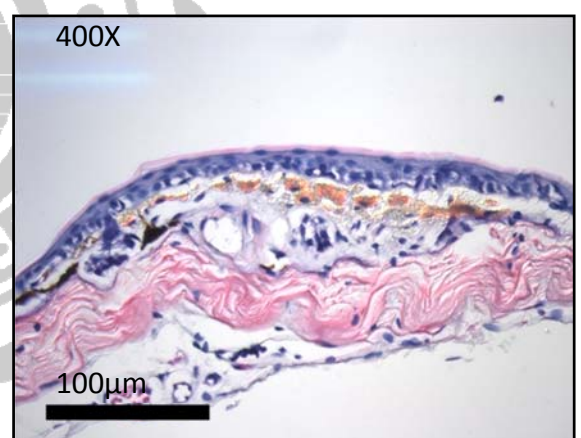
(B)



(C)



(D)

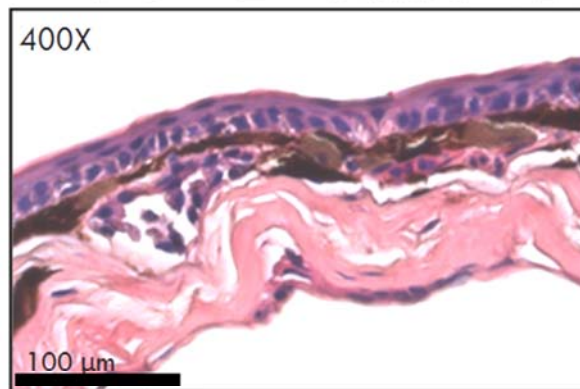


圖四、非繁殖季節面天樹蛙身體各部位的表皮構造切片圖，以蘇木紫-伊紅染色(hematoxylin and eosin stain, H&E stain)，(A)：頭部、(B)：背部、(C)：腹部、(D)：泄殖腔。400X 代表倍率，比例尺等於 100 μm 。

(A)



(B)



圖五、(A)繁殖與(B)非繁殖季節的艾氏樹蛙泄殖腔表皮構造切片圖，以蘇木紫-伊紅染色(hematoxylin and eosin stain, H&E stain)。400X 代表倍率，比例尺等於 100 μm 。

(A)

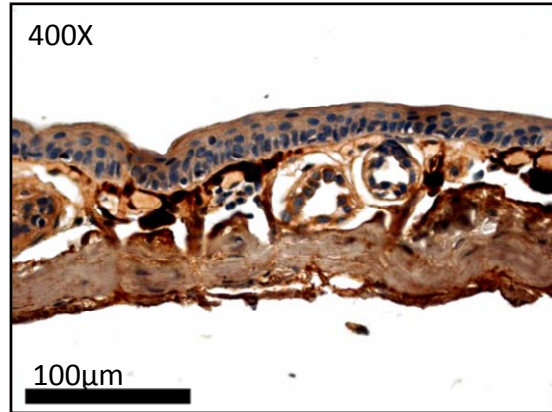


(B)

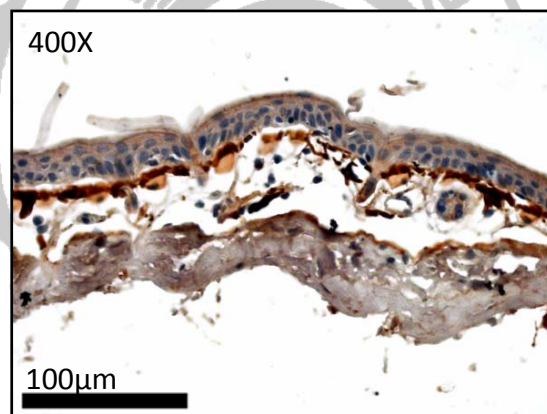


圖六、繁殖季節(A)有撫育和(B)沒有撫育之艾氏樹蛙泄殖腔表皮構造切片圖，以蘇木紫-伊紅染色(hematoxylin and eosin stain, H&E stain)。
400X 代表倍率，比例尺等於 100 μm 。

(A)

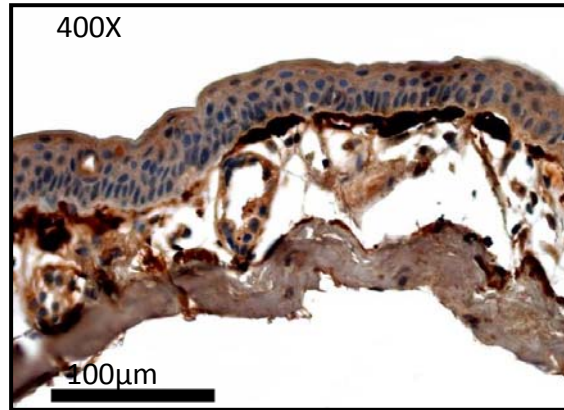


(B)

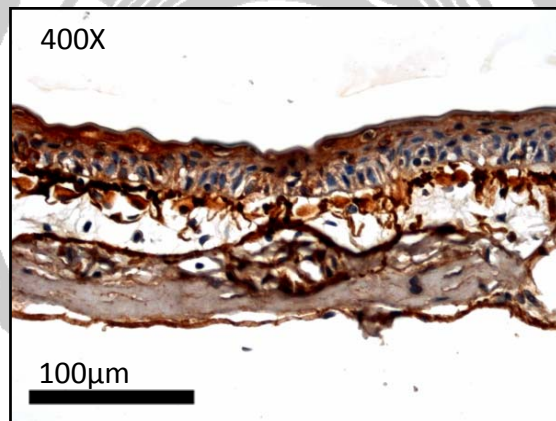


圖七、(A)繁殖與(B)非繁殖季節之艾氏樹蛙泄殖腔表皮構造切片圖，以泌乳激素受體(prolactin receptor, PRLR)染色。400X 代表倍率，比例尺等於 100 μm 。

(A)

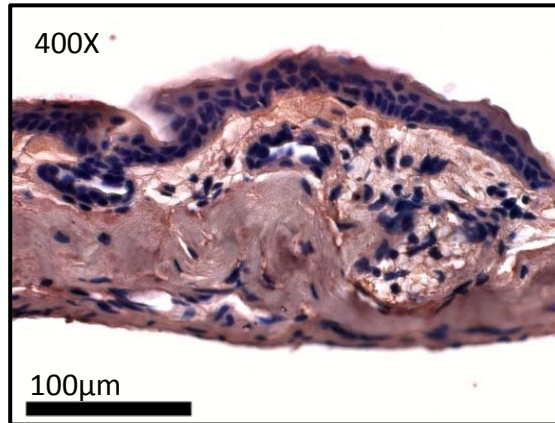


(B)

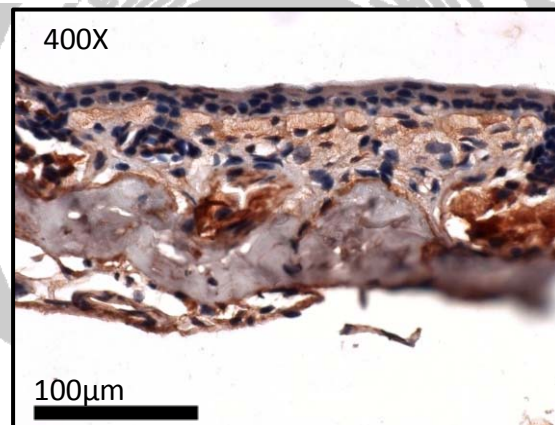


圖八、繁殖季節(A)有撫育和(B)沒有撫育之艾氏樹蛙泄殖腔表皮構造切片圖，以泌乳激素受體(prolactin receptor, PRLR)染色。400X 代倍率，比例尺等於 100 μm 。

(A)



(B)



圖九、(A)繁殖與(B)非繁殖季節之面天樹蛙泄殖腔表皮構造切片圖，以泌乳激素受體(prolactin receptor, PRLR)染色。400X 代表倍率，比例尺等於 100 μm 。