附錄一：微棲地利用調查表

鳳山水庫不同蛙種生態區位利用情形												日期		氣候		
編號	蛙種	個數	行為	陸域								水域				
				離燈距離	柏油路	草地	樹上	林下草地	土壤	林下土壤	斜坡	離水距離	覆蓋物遮蔽度	沉澱物厚度	水深	
01																
02																
03																
04																
05																

趾骨切片標本製作步驟：

i、 將採回趾骨固定於福馬林(formalin)中，保存。

ii、 以 3%硝酸進行趾骨脫鈣，以震盪器搖晃 12 小時。

iii、 脫鈣後，立刻浸泡清水，同樣以震盪器搖晃 12 小時。

iv、 完成脫鈣的趾骨，可保存於福馬林或酒精中，等待切片。

v、 切片。利用冷凍切片機，以 OCT 將趾骨固定於切片台上，以鋼刀切片，厚度約為 20μm。

vi、 將切下的薄片標本沾黏於玻片上，以 Erich's haematoxylin 染色半小時。

vii、 半小時後以清水退染。並將染色完成之趾骨切片以甘油 1:1 水溶液包埋，封片準備觀察。

在顯微鏡下觀察每片骨片生長停滯環(lines of arrested growth, LAGs)各數，以此判斷個體年齡。生長停滯環一般認為出現在個體蟄伏渡冬或渡過乾季，一年一環，可用以判斷年齡。

附錄三：亞洲錦蛙 DNA 萃取純化流程：

1. 取 0.5mL 左右的組織樣本，至於 1.5mL 微量離心管(micro centrifuge tube)。
2. 加入含 0.5 mg/ml 蛋白酶(Kproteinase K)之 300 µl 緩衝液(digestion buffer)。
3. 置於 55 ℃定溫加熱器上，靜置隔夜。
4. 分解完後加入 600 µl 氯仿(chloroform)以及 5M 鋰鹽(LiCl) 300 µl，均勻搖晃 30 分鐘。
5. 而後進行 4℃低溫離心，以 14,000rpm 離心 15 分鐘，抽取上清液約 500 µl 至新微量離心管。
6. 加入 95%冰酒精(alcohol) 1,200 µl，至於-20℃冰箱中冰 20 分鐘。
7. 再次進行 4℃低溫離心，以 14,000rpm 離心 15 分鐘，倒去上清液。
8. 加入 70%酒精(alcohol) 200 µl，輕彈離心管使沉澱物懸浮。
9. 4℃低溫離心，以 14,000rpm 離心 3 分鐘，去上清液，並晾乾。
10. 加入 200 µl 滅菌二次水，至 4℃冰箱保存半天，換至-20℃冰箱保存。

緩衝液配方 100 mM NaCl　　TE: 10mM Tris, pH 7.6
10 mM Tris, pH 7.6　　1mM EDTA, pH 8.0
25 mM EDTA, pH 8.0
0.5% SDS

附錄四：PCR 反應溫度條件設定

	溫度	時間	重複次數
Cycle 1	94℃	1:00	1 x
Cycle 2	94℃	1:00	
	45℃	1:30	
	72℃	1:30	5 x
Cycle 3	94℃	1:00	
	50℃	1:30	
	72℃	1:30	35 x
Cycle 4	72℃	1:00	1 x
Cycle 5	4℃	∞	

PCR 反應體積 20 μl