

# Beitrag zur Tieftemperatur-Markierung von Amphibien im Freiland

## Zweiter Nachtrag

REINER KLEWEN & HEINZ GÜNTER WINTER

Mit 6 Abbildungen

### Abstract

The structure of the amphibian skin and the effects of its marking by the „deep cooling“ method in *Rana esculenta* and *R. temporaria* are described and discussed. The marking is done with metal stamps cooled in dry ice to about  $-80^{\circ}\text{C}$ .

The marking damages both iridophores and melanophores. Histological studies show a beginning of iridophore regeneration after seven months. Melanophores are still absent at this time, leaving the marking still readable.

Since the method damages only a small area of the skin, and only temporarily, it can be recommended for ranids as it has been done for bufonids (GEIGER et al. 1982). In urodeles the underlying corium is much thinner so that the cooling seems to damage muscles, nerves and other tissues. This explanation is at least offered for the failure of its application in urodeles.

Key words: Amphibia; marking by deep cooling method; histological study.

### Einleitung

GEIGER et al. (1982) stellten ein einfaches und den Geboten des Tierschutzes entsprechendes Verfahren zur individuellen Kennzeichnung von Bufoniden vor. In einem ersten Nachtrag wurde seine Einsetzbarkeit bei Urodelen geprüft (KLEWEN 1982). Aufgrund der Ergebnisse war das Verfahren für Bufoniden zu empfehlen, vor seinem Einsatz bei Urodelen hingegen zu warnen, da die Versuchstiere durch die Markierung schwere, teils tödliche Verletzungen erlitten.

In diesem zweiten Nachtrag wird die Tieftemperatur-Markierung an Raniden diskutiert. Zudem liegt die histologische Auswertung der markierten Hautbereiche vor. Aufgrund zahlreicher Anfragen soll an dieser Stelle der Aufbau der Amphibienhaut erläutert werden, soweit für das Verständnis dieses Beitrages erforderlich.

Es sei zunächst anhand eines Querschnitts durch die Bauchdecke von *Rana esculenta* die Struktur unbeschädigten Hautgewebes dargestellt (Abb. 1). Man erkennt deutlich einen relativ gleichförmig gestalteten, aus untereinander sehr

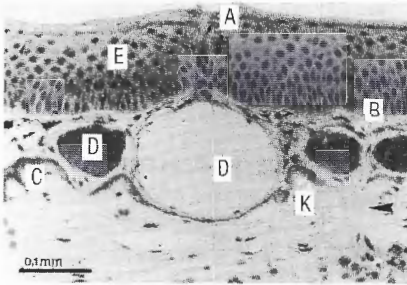


Abb. 1. Querschnitt durch die Bauchhaut von *Rana esculenta*.

Cross section of ventral skin of adult *Rana esculenta*.

Abkürzungen zu den Abbildungen 1-6: A – Drüsenausführgang (glandular excretory canal), B – Basalmembran (basal membrane), C – Corium (corium), D – Drüse (gland), E – Epidermis (epidermis), I – Iridophore (iridophore), K – Kollagenfasern (collagenic fibres), M – Melanophore (melanophore), MU – Muskel (muscle).

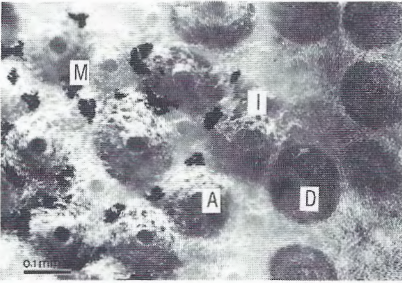


Abb. 2. Hautexplantat aus dem Übergangsbereich von der Markierung (rechts) und dem ungeschädigten Gewebe (links). Die scharfe Abgrenzung zwischen diesen beiden Bereichen wird durch die Kombination von Durch- und Auflicht erkennbar.

Explanted piece of skin, indicating marked (right) and intact area (left). A clear distinction between these areas was obtained by a combination of transmission and light from above.

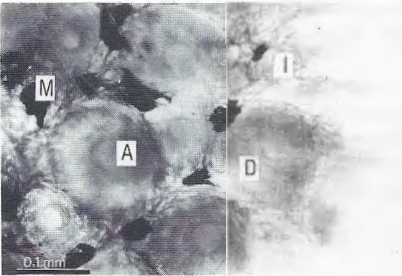


Abb. 3. Im vergrößerten Ausschnitt des Hautexplantats sind im markierten Bereich keine Iridophoren erkennbar (Durchlicht).

Magnified view of skin explant shows the absence of iridophores. Only transmission light was used.

ähnlichen Zellen aufgebauten Bereich im oberen Teil des Bildes: Die Epidermis (E). Unter der Epidermis liegt, durch eine Basalmembran (B) getrennt, das Corium (C). Es besteht im wesentlichen aus Zellen, die im Gegensatz zu denen der Epidermis in lockerer Anordnung liegen. Einige Coriumzellen können unter anderem Kollagenfasern (K) aufbauen, die je nach Dichte und Textur lockere Netzwerke oder dichte, straffe Matten ausbilden können. In dieses stützende Netzwerk eingelagert finden sich Nerven und Sinneszellen sowie zahlreiche Blutgefäße. Farbige Zellen, mit weit verzweigten Ausläufern, bilden ein dichtes Netzwerk um die ebenfalls im Corium dicht gepackt liegenden Gift- und Schleimdrüsen (D). Diese Drüsen stammen aus der Epidermis und sind nur in das Corium hinein verlagert. Deutlich erkennt man ihre Ausführgänge (A) sowie die Ausläufer der Pigmentzellen in der kombinierten Auflicht-Durchlicht-Aufnahme (Abb. 2), ebenso wie in der stärker vergrößerten Durchlicht-Aufnahme derselben Region (Abb. 3).

So vielfältig die Färbungen und Zeichnungen der Amphibien auch sein mögen, hervorgerufen werden sie grundsätzlich von drei verschiedenen Typen von Pigmentzellen: Melanophoren (M), Xanthophoren und Iridophoren (I). Die Melanophoren enthalten schwarzes oder schwarzbraunes Melanin, das innerhalb von Pigmentkörnchen oder Grana in den Zellen vorliegt. Die Pigmentgrana können über die gesamte stark verzweigte Pigmentzelle verteilt sein und den von ihr eingenommenen Gewebebereich dunkel erscheinen lassen oder im Zentrum der Zelle zusammengezogen werden, wodurch der entsprechende Bereich dann heller erscheint. Außer im Corium können Melanophoren auch in der Epidermis vorkommen und sind hier (zum Beispiel bei *Rana esculenta*) verantwortlich für das dorsale schwarze Fleckenmuster.

Der zweite Pigmentzelltyp sind die Xanthophoren. Sie enthalten rote Carotinoide oder orangegelbe bis gelbe Pteridine. Auch sie können außer im Corium in der Epidermis vorkommen. Die Iridophoren unterscheiden sich von den beiden erstgenannten Pigmentzelltypen dadurch, daß sie keine Farbstoffe, sondern reflektierende Plättchen in hochgeordneter Packung enthalten. Diese Plättchen bestehen überwiegend aus Guanin. Sie können durch Reflexion des einfallenden Lichtes weiß bis silbern erscheinen oder aufgrund von Interferenzphänomenen nur einen Teil der einfallenden Wellenlängen reflektieren und so zum Beispiel blau aussehen. Häufig haben die so erzeugten Farben einen besonders leuchtenden oder metallischen Charakter. Alle drei Typen von Pigmentzellen bilden im Corium mehr oder weniger komplizierte funktionelle Gebilde, die Chromatophoreinheiten genannt werden.

## Material und Methode

Versuchstiere: je drei Exemplare von *Rana esculenta* und *Rana temporaria*. Es wurde nach dem von GEIGER et al. (1982) beschriebenen Verfahren markiert: Metallstempel (Kupferlotrundstab) mit den herausgearbeiteten Symbolen Kreis, Strich und Winkel, mit Hilfe von Trockeneis-Alkohol-Mischung auf etwa  $-80^{\circ}\text{C}$  heruntergekühlt, wurden etwa 3s lang leicht auf die Haut der Versuchstiere aufgedrückt. Als Markierungsstelle wählten wir die Bauchseite zwischen den Vorderbeinen.

Zur Klärung der cyto- und histologischen Vorgänge im Integument der Versuchstiere entnahmen wir einem Versuchstier, hier *Rana esculenta*, etwa sieben Monate nach der Markierung eine wenige Quadratmillimeter große Hautprobe aus dem Übergangsbereich zwischen der Markierung und unbeschädigtem Gewebe. Die aus Epidermis und Corium bestehende Hautprobe wurde in Ringerlösung auf einen Objektträger gebracht und lichtmikroskopisch bei Auf- und Durchlicht untersucht. Anschließend Fixierung, Färbung und Verarbeitung zum Dauerpräparat nach allgemein üblichen histologischen Verfahren folgten, um neben der Pigmentausrüstung weitere Einsicht in die cytologischen Verhältnisse zu gewinnen. Zu bedenken war hierbei, daß bei dieser chemischen Behandlung des Gewebes der Alkohol als Lösungsmittel bestimmter Pigmente, insbesondere von Caro-



Abb. 4. Markierung auf der Bauchhaut von *Rana esculenta* nach sieben Tagen.

Ventral skin in *Rana esculenta* seven days after marking.

tinoiden, zu berücksichtigen ist. Im fixierten und dehydrierten Präparat lassen sich Melanophoren und Iridophoren (Abb. 3) deutlich erkennen.

### Ergebnisse

Bei den Versuchstieren wurde die Markierung erst nach etwa einem Tag erkennbar. Diese Beobachtung deckt sich mit der bei Bufoniden (siehe hierzu GEIGER et al. 1982). In allen Fällen waren die eingesetzten Symbole abbildungstreu als dunk-

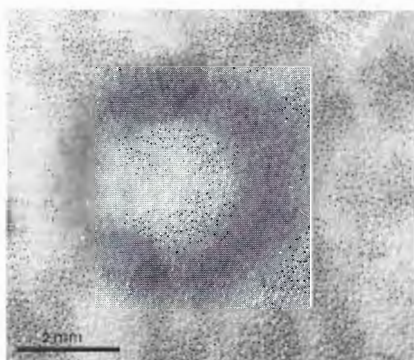


Abb. 5. Ausschnitt aus dem markierten Bereich auf der Bauchhaut von *Rana esculenta* nach circa sieben Monaten.

Part of the marked area of ventral skin in *Rana esculenta* after about seven months.

le Zeichen erkennbar, und zwar erheblich konturschärfer, als dies bei den Bufo-niden der Fall war.

Die Übersichtsaufnahme (Abb. 4) zeigt die mit den verschiedenen Symbolen markierte Bauchseite von *Rana esculenta* einige Tage nach der Behandlung. Die Hautbereiche, die mit dem gekühlten Metallstempel in Berührung gekommen sind, zeigen zunächst eine dichte, flächendeckende Ausbreitung des Melanins. Wie bereits früher angenommen (GEIGER et al. 1982), kommt es vermutlich durch das Absterben der Melanophoren zu einer Freisetzung der Melanosomen, die jedoch im Laufe der Zeit durch Regenerationsprozesse beseitigt werden. Die Großaufnahme (Abb. 5) zeigt die gegenüber dem umgebenden Gewebe dunkler abgesetzte ringförmige Markierung nach sieben Monaten. Auch nach neun Monaten war sie klar identifizierbar.

Die Epidermis ist in der Region der Markierung pigmentlos und erscheint in der Durchlicht- und Auflichtaufnahme transparent, so daß man direkt auf die dort liegenden Drüsen blickt. Man erkennt deutlich, daß das Integument hier seine Färbung überwiegend durch eine flächendeckende Packung von silbrig-weiß reflektierenden Iridophoren erhält, die, wie die hohe Vergrößerung der Abbildung 2 zeigt, lediglich die Drüsenöffnungen frei lassen. Über den Iridophoren liegen zu Flecken angeordnete Melanophoren. Da das Tier auf hellem Grund gehalten wurde, liegt das Melanin stark kontrahiert vor, und die Bauchseite des Tieres erscheint, mit bloßem Auge betrachtet, überwiegend weißlich. Erst die Vergrößerung zeigt sie als kleine schwarze Punkte.

Betrachten wir nun den Grenzbereich von einer markierten Region zur unbehandelten Umgebung, so fällt auf, daß das geschilderte Muster offensichtlich eine Störung aufweist. Die histologische Analyse eines solchen Grenzbereichs ergibt, daß Pigmentzellen, Melanophoren und Iridophoren im Bereich der Markierungsregion nicht vorhanden sind. Ein solches pigmentloses Gewebe wird somit, je nach Stärke, durchsichtig bis transparent (Abb. 3 u. 5). Abbildung 2, die durch Kombination von Auflicht und Durchlicht erstellt wurde, zeigt dies im rechten Bildteil, der der behandelten Region entspricht. Hier kann man im Durchlicht die Hautdrüsen, deren Inhaltsstoffe leicht angefärbt wurden, bis in tiefere Bereiche des Coriums hinein als kugelige Gebilde ausmachen. Im linken Teil der Aufnahme jedoch bewirkt das flächendeckende dichte Ausläufernetz der Iridophoren, daß das auftreffende Licht reflektiert wird und ihm somit der Weg durch die Gewebeprobe versperrt ist. Einblicke in tiefer liegende Coriumbereiche sind hier nicht möglich.

Abbildung 3 zeigt einen stärker vergrößerten Ausschnitt aus diesem Gewebebereich bei reinem Durchlicht. Sie verdeutlicht, wie das den Drüsen dicht anliegende Ausläufersystem der Iridophoren, das hier aufgrund des Durchlichts nicht reflektiert, sondern sozusagen als Schattenriß klarer seine filigrane Textur enthüllt, eine mehr und mehr zunehmende Ausdünnung zum markierten Bereich im rechten Teil des Bildes hin erfährt. Ein ähnlicher Gradient läßt sich für die Drüsen hinsichtlich der Anfärbbarkeit ihrer Inhaltsstoffe erstellen. Dies legt die Vermutung nahe, daß in den zentralen Markierungsbereichen zumindest eine noch verminderte Drüsenfunktion vorliegt. Ihre strukturelle Wiederherstellung scheint

aber auch in diesen Zonen nach etwa sieben Monaten bereits wieder abgeschlossen zu sein.

Die geschilderten Befunde ergeben eindeutig, daß es durch Markierung mit in Trockeneis gekühlten Metallstempeln im Corium der Anurenhaut zu einem langandauernden Pigmentverlust kommt. Die Markierung läßt eine helle, dunkel durchbrochene Binnenstruktur, die tiefer im Corium liegt, erkennen. Hierbei handelt es sich wohl um die selbst hell reflektierende dichte Lage von Kollagenfasern im basalen Coriumbereich, die im Querschnitt regelmäßig durchbrochene Zonen erkennen läßt. Im äußersten rechten Bildteil der Abbildung 1 liegt eine solche Struktur vor, erkennbar an den beidseitig gegen die Kollagenfaserschicht vorspringenden (peripher getroffenen) Gewebezapfen (siehe Pfeil). Etwa 7 Monate nach der Markierung sind tief im markierten Bereich erste Regenerationsprozesse nachzuweisen. Einzeln oder in weitverstreuten Gruppen auftretende Iridophoren beginnen mit der Wiederherstellung des alten Pigmentsystems. Melanophoren konnten jedoch noch in keinem Fall nachgewiesen werden.

### Diskussion

Legen wir die Ergebnisse von GEIGER et al. (1982) und der vorliegenden Arbeit zugrunde, so ist das Verfahren der Tieftemperatur-Markierung für die einheimischen Bufoniden und Raniden als geeignete Methode zur individuellen Markierung zu empfehlen. Dies gilt insbesondere unter dem Gesichtspunkt des Tiereschutzes, da keine Dauerschäden bei den markierten Tieren hervorgerufen werden; ebenso kann man davon ausgehen, daß die lokale Unterkühlung die Versuchstiere nicht beeinträchtigt, da keinerlei Abwehrreaktionen bei Annäherung des gekühlten Stempels und dessen Aufbringen auf die Haut zu erkennen waren. Alle eingesetzten Versuchstiere häuteten sich im Beobachtungszeitraum mehrfach ohne Schwierigkeiten — ein weiteres Indiz für die Unbedenklichkeit des Verfahrens.

Das Versagen dieser Methode bei allen bisher getesteten Urodelen (KLEWEN 1982) ist möglicherweise darauf zurückzuführen, daß trotz prinzipiell gleichartigem Aufbau des Amphibieninteguments einige anatomische und histologische Unterschiede zwischen Urodelen und Anuren vorhanden sind. Als Vergleich zum

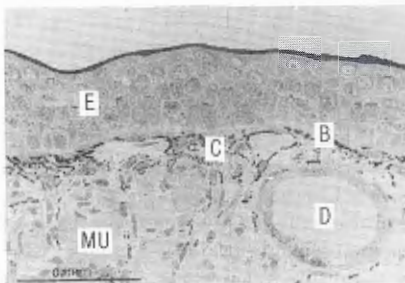


Abb. 6. Querschnitt durch die Haut der Schwanzregion von *Salamandra salamandra terrestris*.

Cross section of skin in tail region of *Salamandra salamandra terrestris*.

bereits beschriebenen Integument von *Rana esculenta* wählten wir einen Querschnitt durch die Schwanzregion von *Salamandra salamandra*. Stellt man die Maßstäbe der Abbildungen 1 und 6 in Rechnung, wird klar, daß die Epidermis bei *Rana esculenta* etwa doppelt so dick ist wie die des Feuersalamanders. Bei dem entsprechenden Vergleich für das Corium zeigt sich, daß dieses beim Salamander mit etwa 0,02 mm nur ungefähr ein Zehntel der Dicke des Coriums von *Rana esculenta* aufweist. Während sich bei den Anuren basalwärts ein System aus großen Lymphsäcken anschließt, liegen bei den Urodelen in einer vergleichbaren Tiefe bereits Nerven und Muskulatur (MU). Somit führt das kurzzeitige Aufdrücken eines auf circa  $-80^{\circ}\text{C}$  gekühlten Metallstempels auf die Epidermisoberfläche bei den Schwanzlurchen bereits zu einer Schädigung von Geweben im Bereich der Muskulatur, der Nerven oder der inneren Organe. Demgegenüber endet die Gewebeschädigung bei den Anuren an der relativ zellfreien Region der mächtig ausgebildeten Kollagenfaserzüge im tieferen basalen Corium (Abb. 1). Ergänzende Versuche, durch Variation der Temperatur (etwa  $-20^{\circ}\text{C}$ ,  $-40^{\circ}\text{C}$ ,  $-60^{\circ}\text{C}$ ) die Möglichkeit der Markierung von Urodelen ohne Verletzung zu prüfen, führten zu keinem positiven Ergebnis (KLEWEN 1982).

#### Zusammenfassung

Nach einer kurzen Einführung in die histologischen Verhältnisse in der Amphibienhaut wird beschrieben, welchen Einfluß die Tieftemperatur-Markierung auf die Haut von *Rana esculenta* hat. Die Befunde werden anhand mikroskopischer Aufnahmen erläutert und abschließend diskutiert. Das negative Ergebnis der Markierungsversuche bei Urodelen wird anhand histologischer und anatomischer Unterschiede der Haut und des lymphatischen Systems zu erklären versucht.

#### Schriften

GEIGER, A., R. KLEWEN & M. NIEKISCH (1982): Beitrag zur Tieftemperatur-Markierung von Amphibien im Freiland. — *Salamandra*, Frankfurt, 18 (1/2): 41-48.

KLEWEN, R. (1982 [ausgel. 1984]): Beitrag zur Tieftemperatur-Markierung von Amphibien im Freiland. Erster Nachtrag. — *Salamandra*, Frankfurt, 18 (3/4): 342-347.

Eine umfassende Literaturzusammenstellung zum Themenkreis „Markierung“ findet sich in den beiden oben genannten Arbeiten.

Eingangsdatum: 19. Juni 1985

Verfasser: Dr. REINER KLEWEN, Zoologisches Institut der Universität zu Köln, I. Lehrstuhl: Experimentelle Morphologie, Weyertal 119, D-5000 Köln 41; HEINZ GÜNTER WINTER, Diederichstraße 37, D-5360 Remscheid.