

Aus dem Anatomischen Institut der Humboldt-Universität zu Berlin
Direktor: Prof. Dr. Walter Kirsche

Nachzucht bei vollständig metamorphosierten Axolotln (*Ambystoma mexicanum*)

Wolfram Richter

Zwei Abbildungen

Eingegangen am 23. Januar 1967

Inhalt: Einleitung — Eigene Beobachtungen — Diskussion — Zusammenfassung — Summary — Schriften.

Einleitung

Seit der Zusammenhang zwischen Metamorphose und Endokrinium, bzw. auch der zwischen Ausbleiben der Metamorphose und Hormonwirkungen bei Amphibien geklärt wurde (GUDERNATSCH, 1912; ROMEIS, 1914, 1915; ADLER, 1916; ALLEN, 1927; DE FREMERY, 1928; KLATT, 1931; MARX, 1935 u. a.), haben die Neotenie und die experimentell ausgelöste Metamorphose ständig ein breites Interesse gefunden. Viele endokrinologische Probleme, aber auch allgemein-biologische Fragestellungen konnten durch diese Experimente geklärt werden. Heute sind häufig biologische Beobachtungen „Nebenbefunde“ experimenteller Arbeiten. Auch im vorliegenden Fall wurde die Metamorphose experimentell erzeugt, um ihren Einfluß auf Regenerationsvorgänge zu studieren.

Das klassische Objekt für die Beobachtung der Neotenie stellt der mexikanische Axolotl dar, der stets total neoten ist, und dessen spontane Metamorphose erstmals von DUMÉRIL (1867) beschrieben wurde. Eine historische Literaturbetrachtung wird erschwert durch die sehr unterschiedliche Nomenklatur in den ersten Jahrzehnten der Neotonieforschung. Häufig wurde die neotone Larvenform des Axolotl anders benannt als die metamorphosierte Adultform. Man betrachtete sogar beide Formen als unterschiedliche Arten (MARSH, 1868; WEISMANN, 1875; CHAUVIN, 1876; WIEDERSHEIM, 1879; WERNER, 1930).

Auch die Einführung des Neotonie-Begriffes (KOLLMANN, 1884) mit der Erkenntnis, daß diese Erscheinung bei anderen Amphibien ebenfalls zu beobachten ist, brachte noch keine Klärung. Erst nach Bekanntwerden der hormoninduzierten Metamorphose wurde allgemein anerkannt, daß Larven, und Adultform keine verschiedenen Spezies darstellen.

Nachdem der Hormoneinfluß auf die Metamorphose erwiesen war, folgte eine Vielzahl von Arbeiten über Zusammenhänge zwischen Metamorphose und Schilddrüse (ALLEN, 1919, 1927; HIRSCH, 1929; MARX, 1935; ALESCHIN, 1936; D'ANGELO and CHARIPPER, 1939), zwischen Metamorphose und Hypophyse (ALLEN, 1919; KLATT, 1931, 1933; KLEINSCHMIDT, 1937; HERRE, 1951), zwischen Neotenie und Schilddrüse (ADLER, 1916; KUHN, 1925; GRIMM 1949), sowie über die Wirkung von Thyroxin auf die Metamorphose (ROMEIS, 1915; HERINGA, 1924; GEYER, 1926; PRAHLAD and DeLANNEY, 1965).

Die in der normalen Metamorphose ablaufenden Differenzierungsvorgänge veranlaßten Untersuchungen über Differenzierungsförderung durch Thyroxin (KREMER, 1927; KRICHEL, 1930/31; BAFFONI, 1959), und auch über die Beeinflussung morphogenetischer Vorgänge, besonders im Zentralnervensystem (WEISS and ROSSETTI, 1951; BAFFONI, 1959, 1960). Ebenso wurde der Einfluß der induzierten Metamorphose oder der Thyroxin-

behandlung auf die Regeneration untersucht (ROMEIS, 1915; LECAMP, 1952; KIRSCH und RICHTER, 1965). Die neuesten Fragestellungen richten sich auf den Zusammenhang zwischen Metamorphose und Neurosekretion (SREBRO, 1965; RAPOLA und Mitarbeiter, 1965).

Neben zusammenfassenden Darstellungen über die Metamorphose (BAFFONI, 1960) sind von besonderem Interesse Arbeiten über das Wesen der Neotonie (WOLTERSTORFF, 1896; DE FREMERY, 1928; INGRAM, 1929; LA-FRENTZ, 1929; TANIGUCHI, 1931; FREYTAG, 1947; TOIVONEN, 1952; BENL, 1965). Dabei gilt unsere Aufmerksamkeit selbstverständlich Beschreibungen der spontanen und

Über die interessante Frage, ob es möglich ist, von spontan oder induziert metamorphosierten Axolotln Nachzucht zu erhalten, konnte ich in der Literatur nur einige sehr unsichere Angaben finden. So erwähnt CHAUVIN (1876) die Mitteilung von BLANCHARD, daß metamorphosierte Axolotl Laich produziert hätten, kritisiert aber gleichzeitig, daß keine Fortpflanzungsfähigkeit erwiesen sei, wenn man nicht die Fruchtbarkeit der Eier festgestellt habe. WOLTERSTORFF (1929) berichtet über eine Angabe von VAILLANT (1876) hinsichtlich der Nachzucht metamorphosierter Axolotl, weist jedoch darauf hin, daß diese oft zitierte Arbeit an der angegebenen Stelle (Bull. Soc. phil. Paris) nicht zu finden sei!

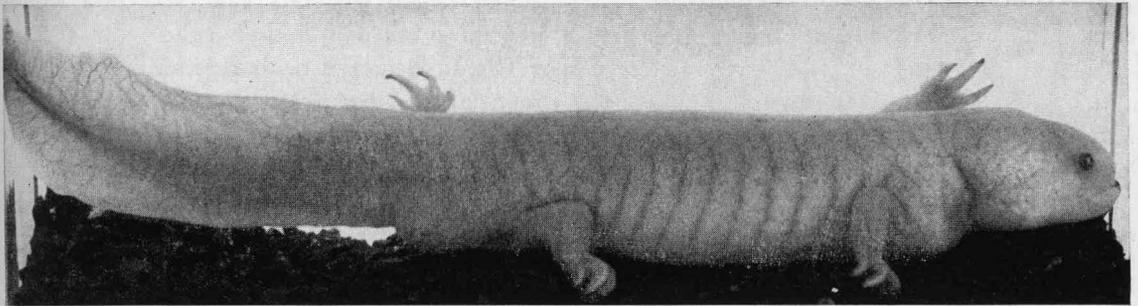


Abb. 1 Männlicher Axolotl (*Ambystoma mexicanum*) 5 $\frac{1}{2}$ Jahre nach der experimentell erzeugten Metamorphose. Körperlänge 22 cm.

Axolotl male (*Ambystoma mexicanum*) 5 $\frac{1}{2}$ years after metamorphosis induced experimentally. Body length 22 cm.

induzierten Metamorphose des total neotenen Axolotl. Hierzu ist ein Hinweis von FREYTAG (1947) außerordentlich bemerkenswert, daß „das Verhalten neotenischer Axolotl der Verhaltensweise der Wassermolchlarven entspricht, während das von *Proteus anguineus* demjenigen adulter Salamandriden entspricht.“ Damit wurde die wichtige Rolle der Verhaltensbeobachtung betont, die man in der Neotenieforschung bisher über den morphologischen und allgemein-biologischen Tatsachen leider vernachlässigt hatte.

Daß in der Fülle der modernen Literatur über induzierte Metamorphose und bei der Vielzahl der heute zum Zwecke biologischer Standardisierung von Medikamenten durchgeführten experimentellen Metamorphosen keine Angaben über Nachzucht vorhanden sind, erscheint verwunderlich, läßt aber darauf schließen, daß besondere Umstände Voraussetzung für die Vermehrung metamorphosierter Axolotl darstellen.

Schon CHAUVIN (1876) diskutiert als eine der möglichen Ursachen für die „Sterilität“ der

adulten Axolotl den durch Freßunlust hervorgerufenen mangelhaften Ernährungszustand. Aus diesem Grunde und auch wegen der häufigen Überdosierung der metamorphoseauslösenden Hormone erreichen die Tiere meist nur ein geringes Lebensalter nach der Metamorphose. So lebten bei PRAHLAD und DeLANNEY (1965) Axolotl nach Trijodthyronin-Metamorphose nur einen Monat. WIEDERSHEIM (1879) berichtet, daß die CHAUVIN-WEIS-MANN'schen Tiere zu diesem Zeitpunkt dreijährig bei vollem Wohlbefinden lebten. Aber offensichtlich war auch dieser Zeitraum für die Tiere zu kurz, um fortpflanzungsfähig zu werden. Interessant ist in diesem Zusammenhang die Feststellung, daß die Axolotl in ihrer Heimat (Xochimilco-See) sich niemals verwandeln, sondern sich stets neoten vermehren (WÖLTERSTORFF, 1929; LAFRENTZ, 1929).

Eigene Beobachtungen

Im Rahmen experimenteller Untersuchungen wurden 50 Axolotl durch Verfütterung von Schilddrüse bzw. durch Injektionen von Trijodthyronin metamorphosiert. Die Durchschnittslänge der 6 Monate alten Tiere betrug bei Beginn der Experimente 8,0 cm. Bei der Umwandlung durch Schilddrüsensubstanz waren 10 Fütterungen im Abstand von jeweils 2 Tagen erforderlich. Die Metamorphose war bei allen Exemplaren nach 22 Tagen weitgehend abgeschlossen. Bei der Applikation von Trijodthyronin wurde eine Lösung in einer Konzentration von 5 µg/ml intraperitoneal injiziert. Jedes Tier erhielt in Abständen von 2 Tagen eine Injektion von 0,1 ml dieser Lösung. Nach 10 Injektionen war bei den meisten Larven die Metamorphose weitgehend beendet. Nur etwa $\frac{1}{3}$ der Tiere benötigten eine 11. Injektion. Insgesamt war auch nach Trijodthyroninbehandlung die Metamorphose nach 23 Tagen bei allen Tieren fast abgeschlossen. Sehr schwierig gestaltete sich die Ernährung der Tiere. Vom 6. Tage nach der Metamorphose an wurden die Axolotl zwangsweise ernährt, indem ihnen *Tubifex* mit einer Pinzette tief in

den geöffneten Rachen eingeführt wurden. Eigene Schnappbewegungen konnten erst am 33. Tag nach der Metamorphose registriert werden und erst ab 63. Tag schnappten alle Tiere selbständig nach vorgehaltenem Futter. Etwa $\frac{1}{2}$ Jahr nach der Metamorphose konnte Fütterung mit kleingeschnittenem Pferdefleisch beginnen. Zusätzlich boten wir *Tubifex*, Enchyträen und Regenwürmer.

Die Tiere wurden zunächst in einem Aquaterrarium gehalten. Da aber zu beobachten war, daß sie nie den Landteil aufsuchten sondern stets aquatil lebten, werden sie ab 3. Monat nach der Metamorphose in einem Becken mit fließendem Wasser von etwa 14–18°C bei einem Wasserstand von 15 cm gehalten. Sie schwimmen dabei in gewissen Abständen zum Luftholen an die Oberfläche. In den Zwischenzeiten liegen sie stets sehr still und wenig beweglich auf dem Beckengrund.

Die zunächst zu beobachtende Wachstumsretardation gegenüber gleichalten neotenen Larven glich sich im Laufe der Zeit aus. Jetzt, $5\frac{1}{2}$ Jahre nach der Metamorphose, haben die metamorphosierten Axolotl eine Körperlänge von 20–22 cm erreicht. Nur sind sie schlanker als neotene Larven und zeigen die bekannten Veränderungen der äußeren Form (Abb. 2).

Erste Anzeichen für eine Fortpflanzungsbereitschaft zeigten sich $3\frac{1}{2}$ Jahre nach der Metamorphose bei den bis dahin etwa 18 bis 20 cm langen Tieren. Man konnte bei den Männchen eine Vergrößerung der Kloakendrüsen bemerken. Die Weibchen zeigten einen geschwollenen Leib, starke Gefäßinjektion der Haut, sowie eine ungewohnte Beweglichkeit und Freßunlust. Zu dieser Zeit verendeten nacheinander alle $3\frac{1}{2}$ Jahre alten ♀♀ unter den Zeichen der Laichverhaltung. 1 Jahr später war bei den Männchen außer der noch stärkeren Vergrößerung der Kloakendrüsen ebenfalls Hautgefäßinjektion und Unruhe zu beobachten. Nachdem ein ♂ von $4\frac{1}{2}$ Jahren mit einem 1 Jahr jüngeren ♀ ($3\frac{1}{2}$ Jahre nach der Metamorphose) in einem Becken mit 15 cm Wasserstand, 16 °C, isoliert gehalten wurden, produ-

zierte dieses Paar den ersten befruchteten Laich, den das Weibchen an Laichstäbe klebte. Aus diesem Gelege von etwa 150 Eiern schlüpften nach 23 Tagen ($16-18^{\circ}\text{C}$) die ersten Larven. Dasselbe Paar laichte noch einmal 5 Wochen später. Diesmal umfaßte das Gelege etwa 420 Eier. Beide Laichzeiten fielen in den Monat Januar bzw. Februar. Aus dem zweiten Laich schlüpften die Larven ebenfalls nach 23 Tagen. Während in dem ersten Gelege bei der Aufzucht der Laven große Verluste eintraten, konnten aus dem zweiten etwa 300 Larven aufgezogen werden. Nach fast einem Jahr ist bei keiner dieser Larven ein Zeichen von spontaner Metamorphose zu beobachten. Sie haben inzwischen eine Körperlänge von $16-18\text{ cm}$ erreicht.

Diskussion

Experimentell metamorphosierte Axolotl sind fortpflanzungsfähig. Allerdings liegt der Zeitpunkt des Erreichens der Fortpflanzungsfähigkeit sehr lange nach der Metamorphose. Möglicherweise setzt die Fortpflanzungsfähigkeit bei den Weibchen früher ein als bei den Männchen. Bei den von mir beobachteten Tieren scheint dies zuzutreffen, denn alle $3\frac{1}{2}$ Jahre alten ♀♀ gingen in Gemeinschaft mit gleichalten ♂♂ an Laichverhaltung zugrunde. Andererseits konnte ich ein Jahr später beobachten, daß ein $3\frac{1}{2}$ Jahre altes Weibchen mit einem $4\frac{1}{2}$ Jahre alten Männchen fruchtbaren Laich zeugte. Allerdings sei einschränkend gesagt, daß eine Verallgemeinerung dieser Befunde nicht möglich ist, da die Zahl der Beobachtungsfälle viel zu gering ist.

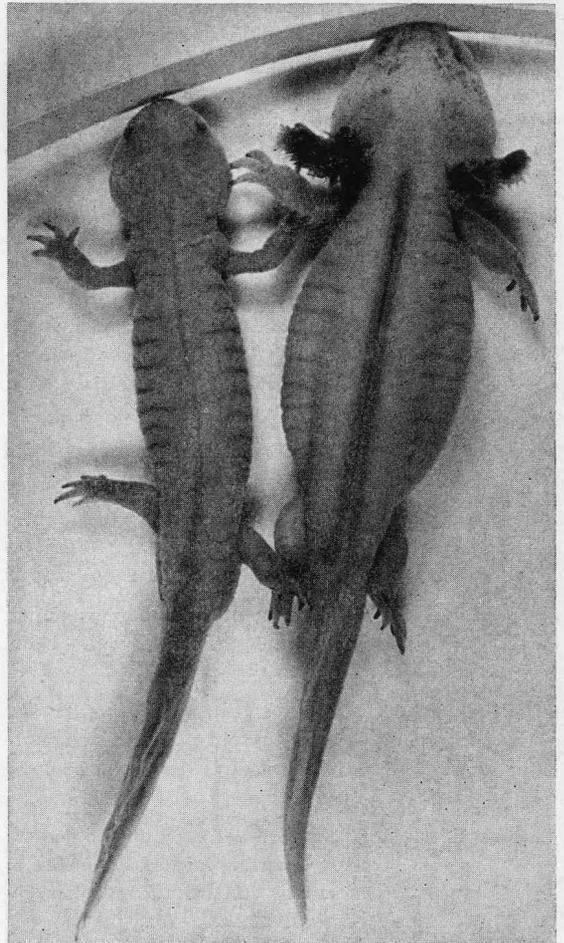
Wegen der ungünstigen Ernährungsmöglichkeit kurz nach der Metamorphose und wegen der späten Fertilität fehlen anscheinend auch bisher in der Literatur Angaben über Nachzucht bei metamorphosierten Axolotln. In fast allen experimentellen Beobachtungsreihen werden die Untersuchungen vor dem 3. bis 4. Jahr abgebrochen, so daß Versuchstiere sehr selten dieses Alter erreichen.

Die Tatsache, daß die Nachzucht in dem von mir beobachteten Fall zu 100% neoten bleibt, bestätigt die Annahme, daß es sich bei *Ambystoma mexicanum* um eine totale Neotenieform handelt.

Abb. 2 $5\frac{1}{2}$ Jahre alter metamorphosierter Axolotl (links, 22 cm) und gleichaltes neotenes Tier (rechts, 24 cm).

$5\frac{1}{2}$ years old metamorphosized Axolotl (left) and neotene animal of the same age (right).

Fotos: Dr. W. Richter



In bezug auf das Verhalten ist interessant, daß die metamorphosierten Axolotl eine rein aquatile Lebensweise bevorzugen, auch wenn ihnen die Möglichkeit zum Landaufenthalt geboten wird.

ZUSAMMENFASSUNG

Nach experimentell erzeugter Metamorphose leben Axolotl, die sonst gänzlich neoten sind, rein aquatil. Ein Männchen, dessen Alter nach der Metamorphose 4^{1/2} Jahre betrug, erbrachte mit einem entsprechend 3^{1/2}jährigen Weibchen Laich, der sich normal entwickelte. Alle Larven blieben neoten und wuchsen im Laufe eines Jahres auf 16–18 cm Länge heran.

SUMMARY

After experimentally induced metamorphosis Axolotl, which are usually neotene, live now fully aquatil. One male which was 4^{1/2} years after metamorphosis produced with a relating 3^{1/2} year old female spawn which developed normal. All larvae stayed neotene and grew within one year to a length of 16 to 18 cm.

SCHRIFTEN

- Adler, L. (1916): Untersuchungen über die Entstehung der Amphibienneotenie. Zugleich ein Beitrag zur Physiologie der Amphibienschilddrüse. — Pflügers Arch. ges. Physiol. 164 : 1–101.
- Aleschin, B. W. (1936): Die Schilddrüse in der Entwicklung und in der Metamorphose von *Rana temporaria*. — Acta Zool. 17 : 1–54.
- Allen, B. M. (1919): The development of the thyroid glands of *Bufo* and their normal relation to metamorphosis. — J. Morphol. 32 : 489–506.
- Allen, B. M. (1927): Influence of the hypophysis upon the thyroid gland in amphibian larvae. — Univ. Calif. Publ. Zool. 31 : 53–78.
- D'Angelo, S. A., and H. A. Charipper (1939): The morphology of the thyroid gland in metamorphosing *Rana pipiens*. — J. Morphol. 64 : 355–372.
- Baffoni, G. M. (1959): Effetti dell'ormone tiroideo sul sistema nervoso centrale di larve di Anfibi anuri. Osservazioni sull'attività mitotica. — Boll. Zool. (Torino) 26 : 255–282.
- Baffoni, G. M. (1960): Contributo allo studio della metamorfosi negli Anfibi. — Riv. Biol. (Perugia) 53 : 293–340.
- Benl, G. (1965): Neotenie und Albinismus bei *Triturus vulgaris vulgaris*. — Salamandra 1 : 6–14.
- v. Chauvin, M. (1876): Über die Verwandlung der mexikanischen Axolotl in *Amblystoma*. — Zschr. wiss. Zool. 27 : 522–535.
- Duesberg, J. (1906): Contribution à l'étude des phénomènes histologiques de la métamorphose chez les Amphibiens anoures. — Arch. Biol. 22 : 163–288.
- Duméril, A. (1867): Métamorphoses des Batraciens urodèles à branchies externes du Mexique, dits Axolotls, observés à la ménagerie des Reptiles du Muséum d'histoire naturelle. — Ann. Sci. naturelles (Zoologie) 7 : 229–254.
- Freytag, G. E. (1947): Die Neotenie der Urodelen. — Mitt. Mus. Naturk. Vorges. (Magdeburg) 1 : 5–11.
- Fremery, P. de (1928): Over Neotenie bij *Triton taeniatus* Laur. — Dissert. Utrecht, 176 S.
- Geyer, H. (1926): Über Schilddrüsenfütterung an Axolotl. Bl. Aquar. Terrark. — 37 : 242–245.
- Grimm, H. (1949): Neotenische Molchformen und endemische Struma. — Endokrinologie 26 : 259 bis 269.
- Gudernatsch, J. F. (1912): Feeding experiments on tadpoles. I. The influence of specific organs given as food on growth and differentiation. A contribution to the knowledge of organs with internal secretion. — Arch. Entw.-mech. Organ. 35 : 457–483.
- Heringa, G. C. (1924): Some notes on the thyroid-metamorphosis in tadpoles. — Proc. Kon. Akad. Wetensch. (Amsterdam) 27 : 693–699.
- Herre, W. (1951): Über die Beziehungen zwischen Hypophyse und Schilddrüse bei Urodelenlarven. — Zool. Anz. Suppl. 15 : 312–319.
- Hirsch, G. C. (1929): Metamorphose, Brunst, Neotenie und Schilddrüse bei *Triton taeniatus*. — Mikrokosmos 22 : 65–70.
- Ingram, W. R. (1929): Studies of amphibian neoteny. J. Exp. Zool. 53 : 387–410.
- Keller, R. (1946): Morphogenetische Untersuchungen am Skelett von *Siredon mexicanus* Shaw mit besonderer Berücksichtigung des Ossifikationsmodus beim neotenen Axolotl. — Rev. suisse Zool. 53 : 329–426.

- Kirsche, K., W. Kirsche und W. Richter (1965): Der Einfluß der experimentell erzeugten Metamorphose auf die regenerativen Vorgänge im Vorderhirn von *Ambystoma mexicanum*. — Zschr. mikrosk.-anat. Forsch. 74 : 69—79.
- Klatt, B. (1931): Hypophysenexstirpationen und implantationen an *Triton*larven. — Arch. Entw.-mech. Organ. 123 : 747—791.
- Klatt, B. (1935): Weitere Versuche (Hypophysenexstirpationen und -implantationen) an *Triton*larven. Arch. Entw. mech. Organ. 130 : 79—108.
- Kleinschmidt, A. (1937): Das Verhalten der Melanophoren bei hypophysenektomierten Urodelen (*Ambystoma mexicanum* Shaw und *Triturus vulgaris* L.) und parallele Befunde an einem normal neonoten *Triturus vulgaris*. — Verh. Anat. Ges. 25. Vers. : 262—266.
- Kollmann, J. (1884): Das Überwintern der europäischen Frosch- und Tritonlarven und die Umwandlung des mexikanischen Axolotl. — Verh. naturf. Ges. Basel 7 : 387—389.
- Kremer, J. (1927): Die Metamorphose und ihre Bedeutung für die Zellforschung. II. Amphibia. — Zschr. mikrosk.-anat. Forsch. 9 : 99—233.
- Krichel, W. (1930/31): Der Einfluß thyreoidaler Substanzen auf Larven von *Bufo viridis* und die Bedeutung dieser Stoffe für die Entwicklung der Keimdrüse bis zur Metamorphose. Zool. Jb., Physiol. 48 : 589—666.
- Kuhn, O. (1925): Schilddrüsenfunktion und Neotenie bei Urodelen. — Biol. Zbl. 45 : 483—495.
- Lafrentz, K. (1929—1938): Untersuchungen über die Lebensgeschichte mexikanischer *Ambystoma*-Arten. — Abh. Ber. Mus. Naturk. Vorgesch. (Magdeburg) 6 : 91—127.
- Lecamp, M. (1952): Régénération et métamorphose chez un batracien anoure, *Alystes obstetricans*. Compt. Rend. Acad. Sci. Paris 235 : 1699—1700.
- Marsh, O. C. (1868): Observations on the metamorphosis of *Siredon* into *Amblystoma*. — Amer. J. Science Arts 46 : 364—374.
- Marx, L. (1935): Bedingungen für die Metamorphose des Axolotl. — Ergebn. Biol. 11 : 244—334.
- Prahlad, K. V., and L. E. DeLanney (1965): A study of induced metamorphosis in the axolotl. — J. Exp. Zool. 160 : 137—145.
- Rapola, J., E. L. Heinonen, A. Helpinen, and U. Henriques (1965): Metamorphosis and neurosecretion of *Xenopus laevis*. Neurosecretory activity of praeoptic nuclei during and after prolonged thiourea treatment. — Acta Endocr. 49 : 305—311.
- Romeis, B. (1914): Experimentelle Untersuchungen über die Wirkung innersekretorischer Organe. II. Der Einfluß von Thyreoidea- und Thymusfütterung auf das Wachstum, die Entwicklung und die Regeneration von Anurenlarven. — Arch. Entw.-mech. Organ. 40 : 571—652.
- Romeis, B. (1915): Experimentelle Untersuchungen über die Wirkung innersekretorischer Organe. II. Der Einfluß von Thyreoidea- und Thymusfütterung auf das Wachstum, die Entwicklung und die Regeneration von Anurenlarven. — Arch. Entw.-mech. Organ. 41 : 57—119.
- Srebro, Z., (1965): Observations on neurosecretion in the hypothalamus of metamorphosing amphibia. — Folia Biol. (Kraków) 13 : 257—264.
- Taniguchi, T. (1931): Experimentelle Studien über die Neotenie bei Amphibien. — Folia anat. japon. 9 : 81—90.
- Toivonen, S. (1952): Ein Fall von partieller Neotenie bei *Xenopus laevis* Daudin und experimentelle Untersuchungen zu seiner kausalen Erklärung. Arch. Soc. Zool. Bot. Fennica 6 : 107—123.
- Weismann, A. (1875): Über die Umwandlung des mexikanischen Axolotl in ein *Amblystoma*. — Zschr. wiss. Zool. 25 : 297—3334.
- Weiss, P., and F. Rossetti (1951): Growth responses of opposite sign among different neuron types exposed to thyroid hormone. — Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. 37 : 540—556.
- Werner, F. (1930): Amphibia. — Handbuch d. Zoologie, Bd. VI, 2. Hälfte, Lieferung 1.
- Wiedersheim, R. (1879): Zur Anatomie des *Amblystoma weismanni*. — Zschr. wiss. Zool. 32 : 216 bis 236.
- Wolterstorff, W. (1896): Über die Neotenie der Batrachier. — Zool. Garten (Frankfurt) 37 : 122—125.
- Wolterstorff, W. (1929—1938): Zur Systematik und Biologie der Urodelen Mexikos. — Abh. Ber. Mus. Naturk. Vorgesch. (Magdeburg) 6 : 129 bis 149.

Anschrift des Verfassers:

Oberarzt Dr. Wolfram Richter, Anatomisches Institut der Humboldt-Universität, 104 Berlin, Philippstraße 13