

## REPRODUCCIÓN *EX SITU* EN *AMBYSTOMA GRANULOSUM* Y *AMBYSTOMA LERMAENSE* (AMPHIBIA: AMBYSTOMATIDAE)

Xóchitl AGUILAR-MIGUEL <sup>1</sup>, Gerardo LEGORRETA B.<sup>1</sup>  
y Gustavo CASAS-ANDREU<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Centro de Investigación en Recursos Bióticos, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma del Estado de México. C. P.50000. Toluca Estado de México, MÉXICO.

E-mail: xam@gmail.com; glegob@yahoo.com.mx;

<sup>2</sup> Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, A. P. 70-153, 04510, México D. F., MÉXICO. gcasas@ibiologia.unam.mx

**Aguilar-Miguel, X., G. Legorreta y G. Casas-Andreu.** 2009. Reproducción *ex situ* en *Ambystoma granulorum* y *Ambystoma lermaense* (Amphibia: Ambystomatidae). *Acta Zoológica Mexicana* (n. s.), 25(3): 443-454.

**RESUMEN:** Los anfibios están desapareciendo a nivel mundial. Varias especies se han perdido y miles más están en peligro de extinción. De las especies que están amenazadas, varias no se pueden proteger en su medio natural, por lo que es urgente realizar acciones de conservación *ex situ* que aseguren su preservación. *Ambystoma granulorum* y *Ambystoma lermaense*, son especies prioritarias para iniciar esta estrategia de conservación, ya que son especies endémicas de México y con un estatus de conservación preocupante. Ambas especies han sido poco estudiadas, por lo que en este estudio se investigaron, los aspectos reproductivos que son vitales para la conservación, logrando reproducir a la especie en condiciones de laboratorio de manera natural o espontánea, o por la estimulación hormonal con Gonadotropina Coriónica (hCG). Los resultados obtenidos nos indican que no existen diferencias significativas en la morfología de machos y hembras en ambas especies, excepto por el engrosamiento de la región cloacal en los machos. El ciclo reproductivo es anual y sincrónico en machos y hembras, con actividad máxima entre los meses de mayo a septiembre. Las puestas en parejas sin inducción hormonal fue variable con promedio de  $664 \pm 325$  (DE) huevos y el porcentaje de fecundidad fue de 40 al 90%. En parejas de *Ambystoma granulorum* con inducción de hCG se obtuvieron nueve puestas variables entre 17 y 1182 huevos. En parejas de *A. lermaense* inducidos, se obtuvieron 16 puestas, las que variaron entre 110 y 1691 huevos. La fertilidad de los huevos inducidos fue muy variable analizándose posibles causas.

Palabras clave: *Ambystoma*; *Ambystoma granulorum*; *Ambystoma lermaense*; reproducción; inducción hormonal con hCG.

**Aguilar-Miguel, X., G. Legorreta & G. Casas-Andreu.** 2009. *Ex situ* reproduction in *Ambystoma granulorum* and *Ambystoma lermaense* (Amphibia: Ambystomatidae). *Acta Zoológica Mexicana* (n. s.), 25(3): 443-454.

**ABSTRACT:** Amphibians are disappearing worldwide. Several species have been lost, and thousands are in danger of extinction. Of the threatened species, some can not be protected in their own natural

habitat, therefore it is imperative to accomplish *ex-situ* conservation actions that assure its preservation. *Ambystoma granulosum* and *Ambystoma lermaense*, are species in high priority to be protected by mean of this conservation strategy, since they are endemic species of Mexico and with a concern conservation status. Both species have been little studied, therefore in this study we investigated reproductive aspects that are vital for its conservation, as reproduction in laboratory, and hormonal induction with human chorionic gonadotrophin (hCG). Our results showed not significant difference in the sex morphology for both species, except for the swollen vent in the cloacal region of males. The reproductive cycle is annual and synchronic in males and females, with a maximum of activity from May to September. We obtained clutches only from couples of *A. granulosum* without hormonal induction in variable numbers with an average of  $664 \pm 325$ (SD) eggs and a fecundity from 40 to 90%. We obtained nine clutches from couples of *Ambystoma granulosum* with hCG induction ranging between 17 and 1182 eggs. In couples of *Ambystoma lermaense* induced, were obtained 16 clutches, ranging between 110 and 1691 eggs. We analyzed possible causes for the variability in fertility of eggs obtained by induction.

**Key words:** *Ambystoma*; *Ambystoma granulosum*; *Ambystoma lermaense*; reproduction; hCG hormonal induction.

## INTRODUCCIÓN

En la actualidad el fenómeno de extinción de especies en anfibios es conocido y muy preocupante, lo que indica que estamos enfrentando la crisis de extinción más grande de especies observada por la humanidad (Pounds & Crump 1994, Houlahan *et al.* 2000, Kiesecker *et al.* 2001, Blaustein *et al.* 2003, Carey & Alexander 2003, Daszak *et al.* 2003, Stuart *et al.* 2004, Beebee & Griffiths 2005, McCallum 2007, Roelants *et al.* 2007). La comunidad científica ha planteado como respuesta a esta crisis una estrategia de conservación, la cual consiste en la reproducción *ex situ*, debido a que muchas especies tienen la amenaza de extinción en su propio medio (Gascon *et al.* 2007, Pavajeau *et al.* 2008). En México, más del ochenta y cinco por ciento de las especies de anfibios, se encuentran en alguna categoría de conservación de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN, 2008). Consideramos que las especies prioritarias con las que trabajar esta estrategia de conservación con reproducción *ex situ*, deberían de ser las especies endémicas, siendo prioritario conocer los aspectos básicos para su reproducción.

La biología reproductora de una especie es la combinación de atributos fisiológicos, morfológicos y conductuales que actúan para coordinar la producción de un número óptimo de descendientes bajo ciertas condiciones ambientales. Entre los aspectos que se consideran, se encuentran la gametogénesis, fecundidad, duración del desarrollo, edad reproductiva, esfuerzo reproductivo, limitaciones ambientales y el cuidado parental (Duellman & Trueb 1994).

Existe mucha información para algunas especies en las que se ha realizado reproducción en condiciones de laboratorio como *Rana pipiens* y *Xenopus laevis*, pero la mayoría de las especies han sido pobremente estudiadas. Esto es importante,

debido a que los anfibios presentan gran diversidad de estrategias reproductivas en comparación con el resto de los vertebrados terrestres (Duellman & Trueb 1994).

Entre los anfibios de la familia Ambystomatidae, la especie que más se ha utilizado como objeto de estudio es *Ambystoma mexicanum*, con innumerables trabajos en biología del desarrollo y en evolución; se conoce que los miembros de esta familia presentan una fertilización interna y la ovoposición de huevos es dentro del agua y de manera estacional, anual o bianual, excepto en *Ambystoma ordinarium* que se reproduce durante todo el año (Salthe 1969, Anderson & Worthington 1971).

Nuestro interés para iniciar el desarrollo de la estrategia de conservación *ex situ* en estas salamandras, lo enfocamos en dos especies mexicanas endémicas del Estado de México *Ambystoma granulosum* y *A. lermaense* (Casas-Andreu *et al.* 2003), las cuales han sido poco estudiadas, existiendo sólo algunos datos de reproducción (Aguilar *et al.* 2002), por lo que el propósito de este estudio es conocer aspectos de la biología de la reproducción de ambas especies de manera general, buscando reproducirlas sin inducción hormonal o mediante inducción hormonal con gonadotropina coriónica humana (hCG).

## MATERIAL Y MÉTODOS

De mayo a septiembre del 2001 los individuos de *A. granulosum* (N = 32; 16 machos y 16 hembras) en estado paedomórfico fueron colectados en la localidad del Ermitaño (20° 60' N, 99°53' W) y en la Presa Ignacio Ramírez (19°26' N, 99°45' W) y los de *A. lermaense* (N = 32; 16 machos y 16 hembras) en estado paedomórfico y metamórfico, en San Pedro Tlaltizapan (19°11' N, 99°30' W), todas las localidades en el Estado de México.

Los individuos fueron llevados al Laboratorio de Ecología y Conservación del Centro de Investigaciones y Recursos Bióticos (CIRB) de la Universidad Autónoma del Estado de México, el cual se encuentra localizado dentro de la distribución de una de las especies (*A. granulosum*), con temperatura, fotoperíodo y calidad de agua similares a las del hábitat de la especie.

Para su adaptación al laboratorio después de su captura, se mantuvieron de tres a cinco meses, dependiendo de la fecha de colecta, en acuarios con aireación permanente y se alimentaron inicialmente con una dieta variada a base de crustáceos (acociles), peces y larvas de insecto, alimento natural del sitio de colecta y después de los meses de adaptación se alimentaron con pollo desgrasado y lombriz roja de California (*Eisenia foetida*), tres veces por semana.

Se registraron los siguientes datos morfométricos ( $X \pm DS$ ), longitud hocico-cloaca (LHC) y longitud total (LT) en mm y peso (g) y se compararon mediante una prueba *t* de Student; también se observó la coloración de los ejemplares y el dimorfismo sexual expresado en el abultamiento de la región de la cloaca.

El ciclo reproductor fue registrado de manera mensual durante 2001 mediante la disección de un ovario y testículo de un individuo de cada especie, en los que se realizó el análisis histológico de las gónadas, haciendo inclusión en parafina, con cortes de 5 mm y la tinción con hematoxilina y eosina.

Durante 2002 y 2003, se hicieron las observaciones sobre la reproducción en ambas especies, utilizando 10 parejas de cada una de ellas, las que se colocaron en acuarios ambientados con una parte de tierra, con una capa de musgo, así como refugios artificiales a base de tejas de plástico y una parte con agua, con un filtro de plataforma en el fondo y encima una capa de grava. El ambiente se enriqueció con piedras de río, plantas acuáticas (*Elodea* sp.) y rafia (plástica) como sustrato para la ovoposición ; la temperatura ambiental en la época de reproducción fue de 15 a 25 °C y la temperatura del agua de 14 a 18 °C.

Se estableció el tamaño de la puesta por el número de huevos que contenía. El porcentaje de fertilidad se determinó considerando los huevos en segmentación como evidencia del inicio del desarrollo.

La reproducción por medio de la inducción hormonal se realizó durante los años de 2003-2005, el procedimiento fue inyectar intramuscularmente a la hembra y al macho dorsalmente a nivel de la cloaca en ambas especies. Se utilizó el método propuesto por Armstrong & Gillespie (1981), con dosis de 350 y 500 U. I. (Unidades Internacionales) con la hormona gonadotropina coriónica humana (hCG).

Así mismo se ensayaron dos dosis diferentes a éstas, con 750 y 900 U. I. Para estas repeticiones se utilizaron nueve parejas de *A. granulatum* y dieciséis parejas de *A. lermaense*. En cada acuario se colocó a una hembra con un macho. Se consideró que los machos estaban estimulados por inducción hormonal, al hacer la observación microscópica de espermatozoides en movimiento obtenidos de la región de la cloaca.

## RESULTADOS

Los resultados muestran que se puede mantener tanto a *A. granulatum* como a *A. lermaense* en condiciones de laboratorio, logrando su reproducción. Con las acciones anteriores se estableció una colonia que se ha mantenido por siete años. Ambas especies comparten características reproductoras y también presentan diferencias particulares, en el caso de *A. granulatum* se reproduce más fácilmente en estado paedomórfico, mientras que *A. lermaense* lo hace en estado metamórfico.

El dimorfismo sexual se pudo establecer con base en la talla en la cual alcanzan la madurez gonadal, siendo ésta a partir de los 100 mm de LHC, verificándose mediante análisis histológico, al presentar las hembras ovocitos vitelogénicos y los machos espermatozoides. El único carácter morfológico que se puede reconocer para diferenciar machos de hembras es el abultamiento de la cloaca en los machos, debido principalmente a la gran actividad glandular para la elaboración del espermátforo, mientras que en las hembras ésta es plana y es más pequeña. La observación de todos

los ejemplares muestra que la coloración es variable tanto en hembras como en machos de ambas especies, por lo cual este carácter no se pudo utilizar para su reconocimiento. Los datos morfométricos de cada especie fueron: en *A. granulorum* hembras, longitud total (LT) ( $193.33 \pm 24.89$ ), longitud hocico cloaca (LHC) ( $108.33 \pm 9.61$ ), peso (P) ( $60.07 \pm 15.63$ ) y en machos LT ( $207 \pm 23$ ), LHC ( $112 \pm 10$ ), P ( $51 \pm 19$ ); en *A. lermaense* hembras LT ( $217 \pm 13$ ), LHC ( $120 \pm 6$ ), P ( $64 \pm 9$ ) y en machos LT ( $223 \pm 37$ ), LHC ( $123 \pm 8$ ), P ( $67 \pm 16$ ). No hubo diferencias significativas entre sexos para ambas especies, de acuerdo con los siguientes resultados: en *A. granulorum* de 13 hembras y 21 machos en LT ( $t = 0.138$  p  $0.05$ ), LHC ( $t = 0.376$  p  $0.05$ ) y P ( $t = 0.171$  p  $0.05$ ), en *A. lermaense* de 18 hembras y 34 machos en LT ( $t = 0.370$  p  $0.05$ ), LHC ( $t = 0.243$  p  $0.05$ ) y P ( $t = 0.474$  p  $0.05$ ).

Aún cuando la prueba estadística no muestra diferencias significativas, se puede observar en los datos una ligera tendencia hacia el mayor tamaño y peso de los machos.

Los ciclos reproductivos de *A. granulorum* y *A. lermaense* en condiciones de laboratorio fueron semejantes, presentan un ciclo anual, sincrónico entre machos y hembras, con actividad máxima entre los meses de mayo y septiembre.

El ciclo reproductor de machos muestra una espermatogénesis de tipo longitudinal, con división de las células germinales de manera sincrónica formando quistes, se presentan divisiones de espermatogonias, espermatocitos primarios y espermatocitos secundarios de octubre a diciembre y la espermiogénesis de enero a marzo, finalmente se observan espermatozoides en testículo de marzo a septiembre. Se observó la producción de espermátóforos en 5 parejas de *A. granulorum*, y conductas de cortejo en los meses de mayo a septiembre, cabe señalar que en este aspecto no se tuvo una observación continua.

Por cuanto al ciclo reproductor de hembras, se observó el proceso de ovogénesis en el ovario, reconociéndolo principalmente por los cambios morfológicos de los ovocitos a nivel nuclear, citoplasmático y las características de las células foliculares. En el mes de octubre inicia el proceso de ovogénesis observándose ovocitos previtelogénicos (estadios 1 y 2); en noviembre y diciembre aumenta el número de ovocitos con vitelogénesis temprana (estadios 3 y 4), incrementándose el tamaño y acumulación de vítelo en el citoplasma; en febrero y marzo se observaron ovocitos vitelogénicos en estadio 5; de abril a septiembre el predominio en el ovario es de ovocitos preovulatorios en estadio 6, alcanzando un diámetro promedio de 2000mm, el cual corresponde al tamaño del huevo cuando se realiza la ovoposición; en ambas especies, las puestas fueron de mayo a septiembre.

Para la reproducción en laboratorio se utilizaron diez parejas de cada especie, durante dos años y en dos periodos reproductivos; el resultado en *A. granulorum* fue que el primer año se logró la obtención de seis puestas, con adultos en estado paedomórfico y en el segundo año hubo tres puestas con organismos transformados

a la forma adulta; la puesta fue variable, con un promedio de  $664 \pm 325$  huevos y un porcentaje de fecundidad del 40 al 90%.

En *A. lermaense* no se observó reproducción con las diez parejas utilizadas.

La inducción hormonal con hCG, ya utilizada en otras especies de *Ambystoma* (Armstrong & Gillespie 1981) fue utilizada con el fin de incrementar la reproducción de *A. granulosum* y *A. lermaense* en condiciones de laboratorio, probando dos dosis, con el número de parejas disponibles y considerando las repeticiones en diferentes años.

La inducción de la ovulación en las hembras de *A. granulosum*, con las dosis de 500 y 750 U. I. de hCG, fue de 100% en nueve repeticiones, con un tamaño de puesta variable entre 17 y 1182 huevos (Cuadro 1). En machos la inducción de la espermatogénesis fue de 100% con dosis de 350 y 900 U. I., lo que se determinó por la presencia de espermatozoides con movimiento extraídos de la región de la cloaca. La reproducción en esta especie fue posible con este método de inducción, pero sólo hubo respuesta en una de las nueve parejas empleadas (cuadro 1), con una puesta de 503 huevos y un porcentaje de fertilidad del 94%.

**Cuadro 1.** Resultados de la inducción hormonal en *Ambystoma granulosum*.

Número de repeticiones (No.) año y mes de aplicación de la hormona hCG (U.I.), en hembras y machos y el número de huevos depositados,

No.	año	mes	# de huevos	hCG (U.I.)	
				hembras	machos
1	2003	mayo	416	500	350
2	2003	mayo	665	500	350
3	2003	mayo	332	500	350
4	2003	mayo	475	500	350
5	2003	mayo	17	500	350
6	2003	mayo	166	750	900
7	2005	julio	1182	750	900
8***	2005	julio	503	750	900
9	2005	julio	64	750	900

\*\*\*indica el tratamiento con el que hubo reproducción.

La respuesta a la inducción de la ovulación en *A. lermaense* fue muy parecida, ya que con las dosis de 500 y 700 U. I. utilizadas en hembras de esta especie con dieciséis repeticiones fue del 100%, y con un tamaño de puesta variable entre 110 y 1691 huevos (Cuadro 2).

En esta especie se obtuvieron dos puestas con huevos fértiles con la dosis de 750 U.I. para hembras y de 900 U. I para los machos (cuadro 2). En los machos la inducción fue de un 100% con las dosis de 350 y 900 U. I., lo que se determinó por la presencia de espermatozoides con movimiento extraídos de la región cloacal. La reproducción con este método de inducción sólo fue posible en dos parejas, obteniéndose dos puestas, una con 474 huevos que presentó un índice de fertilidad del 78%, y otra con 156 huevos y un índice de fertilidad del 98%.

**Cuadro 2.** Resultados de la inducción hormonal en *Ambystoma lermaense*.

Número de repeticiones (No.) año y mes de aplicación de la hormona hCG (U.I.), en hembras y machos y el número de huevos depositados

No.	año	mes	# de huevos	hCG (U.I.)	
				hembras	machos
1	2003	julio	381	500	350
2	2003	julio	269	500	350
3	2003	julio	1691	750	900
4***	2003	julio	156	750	900
5	2003	julio	522	750	900
6	2003	julio	858	750	900
7	2004	septiembre	110	500	350
8	2004	septiembre	118	500	350
9	2004	septiembre	260	500	350
10	2004	septiembre	310	500	350
11	2005	mayo	111	500	350
12	2005	mayo	264	500	350
13	2005	mayo	487	750	900
14***	2005	mayo	474	750	900
15	2005	mayo	784	750	900
16	2005	mayo	331	750	900

\*\*\* indica el tratamiento con el que hubo reproducción.

## DISCUSIÓN

De acuerdo con los resultados obtenidos, se puede establecer que en *A. granulatum* y *A. lermaense* es posible la reproducción *ex situ* bajo condiciones de laboratorio, lo cual podría ser utilizado como estrategia de conservación para estas especies amenazadas y endémicas de México.

El Plan de Acción para la Conservación de Anfibios, publicado por la UICN, considera el estado de conservación para este grupo como críticamente amenazado (CR) y recomienda combinar investigación básica, como la realizada en este trabajo, para conocer aspectos de biología de la reproducción y aplicaciones como la inducción hormonal para propagar especies (Gascon *et al.* 2007).

La reproducción y el mantenimiento en condiciones de laboratorio para las dos especies de *Ambystoma* estudiadas es de gran importancia, por los pocos trabajos que se han realizado en Urodelos, ya que fuera del ajolote mexicano (*A. mexicanum*) y varios tritones, pocas especies de este orden se han reproducido *ex situ* (Armstrong *et al.* 1989, Sever 2003).

La biología reproductora de *A. granulatum* y *A. lermaense*, presentan rasgos generales similares. Estos taxa se consideran especies hermanas, con base en datos de aloenzimas, morfología y secuencias de ADN (Shaffer 1984, Shaffer & McKnight 1996, Sever 2003). El dimorfismo sexual en los Urodelos es variable, y en algunas especies los sexos se pueden diferenciar a simple vista por la presencia de caracteres secundarios en su morfología y/o coloración (Halliday 1977, Verrell 1989). En *Ambystoma* el color no es útil para diferenciar el sexo por presentar una alta variabilidad, siendo un carácter que ha evolucionado rápidamente dentro del género (Saffer & McKnight 1996); el carácter que permite reconocer a los machos es el tamaño y la apariencia de la cloaca, cuando están activos durante su ciclo reproductor, de manera similar a lo que sucede en otras especies de urodelos (Duellman & Trueb 1994). Es a partir de los 100 mm de LHC que las dos especies estudiadas alcanzan la maduración gonadal, no habiendo datos sobre talla de madurez sexual de otras especies de *Ambystoma* que permitan establecer comparaciones. En *A. talpoideum*, especie que presenta metamorfosis completa, sólo se ha determinado que la madurez sexual se puede presentar entre uno y dos años después de la metamorfosis (Semlitsch 1985, 1987a, b, Loredó & Van Vuren 1996). En *A. mexicanum*, especie que en condiciones naturales no presenta una metamorfosis completa y ha sido mantenida en laboratorio, la madurez sexual inicia después del primer año de vida (Humphrey 1977; Armstrong *et al.* 1989, Gresens 2004). De acuerdo con observaciones realizadas en nuestro laboratorio a partir de la puesta de huevos y el desarrollo de las larvas, hemos podido determinar que *A. granulatum*, alcanza la talla de madurez sexual a los dos años de edad, aparentemente más tarde que en *A. mexicanum*.

Los ciclos reproductores de *A. granulatum* y *A. lermaense* fueron semejantes en condiciones de laboratorio, presentando un ciclo anual, sincrónico en machos y hembras, con un periodo de mayor actividad en los meses de mayo a septiembre. En comparación con otras especies de *Ambystoma* que se han reproducido en condiciones similares, hay diferencias temporales, por ejemplo, *A. annulatum* se reproduce durante los meses de septiembre a noviembre (Spotila & Beumer 1970), *A. dumerilii* se reproduce durante los meses de febrero a mayo (Brandon 1976), para *A. maculatum* se ha registrado reproducción durante los meses de enero a marzo, y *A. macrodactylum* se reproduce durante los meses de enero y febrero. En el caso de *A. mexicanum* mantenido en laboratorio, se ha observado un patrón de reproducción a lo largo del año, obteniéndose puestas fácilmente durante los meses de enero a

mayo y siendo más difíciles de obtener durante los meses de agosto a octubre (Armstrong *et al.* 1989).

El análisis histológico de la espermatogénesis y la ovogénesis de las dos especies de *Ambystoma* estudiadas, son semejantes a lo reportado en salamandras de zonas templadas; la espermatogénesis es semejante a la de *A. tigrinum* (Norris *et al.* 1985), *A. mexicanum* (Miltner y Armstrong 1983) y *A. dumerilii* (Uribe 2001, 2003b), mientras que la ovogénesis es similar a la de *A. dumerilii* (Uribe 2003a).

La reproducción de *A. granulosum* en condiciones de laboratorio se logró durante el primer año con seis puestas y tres durante el segundo, con una variación en el número de huevos ovipositados de  $664 \pm 325$  (DS). El tamaño promedio de la puesta de *A. mexicanum* en condiciones de laboratorio es de 934 huevos (Armstrong *et al.* 1989), mientras que el de *A. andersoni* es de 518 huevos (Huacuz 2001) y en *A. lermaense* se ha observado una puesta de 841 huevos (Aguilar *et al.* 2002). Estos tamaños de puesta son grandes comparados con los de otras especies de *Ambystoma* que se reproducen en condiciones naturales, como en *A. gracile* (Knudsen 1960) que es de 77 huevos y en *A. macrodactylum* de 307 huevos (Knudsen 1960, Anderson 1967).

La fecundidad en *A. granulosum* fue de 40 al 90%, similar a la de *A. mexicanum* (Forbes & Forbes 1979) y parecida a la *A. dumerilii*, que es entre 59 y 94 % (Huacuz 2001), y es mayor que en el caso de *A. lermaense* que presentó un 26% de fecundidad (Aguilar *et al.* 2002).

La respuesta a la estimulación hormonal con hCG en *A. granulosum* y *A. lermaense*, fue positiva en los dos sexos, ya que hubo respuesta en la ovulación en las hembras y la producción de espermatozoides en los machos, correspondiendo a la activación del ciclo hormonal conocido en anuros (McCreery & Linch 1982) y en salamandras (Mazzi *et al.* 1974). En los primeros trabajos sobre la inducción de la oviposición y la reproducción con hCG en *A. mexicanum*, se obtuvieron puestas de 400 a 500 huevos, con porcentajes de fecundidad similares a los obtenidos en este estudio (Trottier & Armstrong 1975, Armstrong & Gillespie 1981). Es importante considerar otros factores que pudieran tener efectos sobre la reproducción de estas especies, por ejemplo, individuos de *A. opacum* confinados en laboratorio mostraron niveles relativamente bajos de los andrógenos Testosterona (T) y Dihidrotestosterona (DHT) en el plasma y niveles altos de corticosteroides asociados al estrés del cautiverio, lo que se considera altera la reproducción de esta especie (Zerani *et al.* 1991, Houck *et al.* 1996). Para mejorar el éxito reproductivo en estas especies se deberán considerar también los efectos de la selección sexual y la conducta reproductora, de importancia para los Urodelos (Houck & Reagan 1990, Houck & Arnold 2003).

**AGRADECIMIENTOS.**- A la Secretaría de Investigación y Estudios Avanzados de la Universidad Autónoma del Estado de México y al Instituto de Biología de la UNAM por el financiamiento otorgado para la realización de esta investigación. A los estudiantes que participaron en los inicios y durante esta investigación. Así como también al Dr. J. Carlos Vázquez C. y al M. V. Z. Joel Sánchez Z. Site Manager de INTERVET México, por la donación de las hormonas empleadas en este estudio. Se agradece especialmente a los revisores anónimos de este trabajo, que con su crítica, contribuyeron en forma importante a su mejoría.

## LITERATURA CITADA

- Aguilar, X., G. Casas & E. Pineda.** 2002. Natural history notes: *Ambystoma lermaense* (Lake Lerma Salamander). Reproduction and development. *Herpetological Review* 33:197.
- Anderson, J. D.** 1967. A comparison of the life histories of coastal and montane populations of *Ambystoma macrodactylum* in California. *The American Midland Naturalist* 77:323-355.
- Anderson, J. D. & R. D. Worthington.** 1971. The life history of the Mexican salamander *Ambystoma ordinarium* Taylor. *Herpetologica* 27:165-176.
- Armstrong, J. B. & L. L. Gillespie.** 1989. Induced spawnings and artificial insemination in the axolotl. *Axolotl Newsletter* 10:1-4.
- Armstrong, J. B. & L. L. Gillespie.** S. T. Duhon & G. M. Malacinski. 1989. Raising the axolotl in captivity. Pp. 220-227. In: J.B. Armstrong and G. Malacinski (eds.), *Developmental Biology of the Axolotl*. Oxford University Press, New York.
- Beebee, T. J. C. & R. A. Griffiths.** 2005. The amphibian decline crisis: a watershed for conservation biology? *Biological Conservation* 125: 271-285.
- Blaustein, A. R., J. M. Romansic, J. M., Kiesecker & A.C. Hatch.** 2003. Ultraviolet radiation, toxic chemicals and amphibian population declines. *Diversity and distributions* 9: 123-140.
- Brandon, R. A.** 1961. A comparison of the larvae of five northeastern species of *Ambystoma* (Amphibia; Caudata). *Copeia* 1961:377-383.
- Carey, C. & M. A. Alexander.** 2003. Climate change and amphibian declines: is there a link? *Diversity and Distributions* 9: 111-121.
- Casas-Andreu, G., R. Cruz-Aviña & X. Aguilar-Miguel.** 2003. Un regalo poco conocido de México al mundo: el Axolote o Axólotl (*Ambystoma*: Caudata: Amphibia). Con algunas notas sobre la crítica situación de sus poblaciones. *Ciencia ergo sum* 10: 304-308.
- Daszak, P., Cunningham A. A. & A. D. Hyatt.** 2003. Infectious disease and amphibian population declines. *Diversity and Distributions* 9: 141-150.
- Duellman, W. E & L. Trueb.** 1994. *Biology of Amphibians*. McGraw Hill, New York.
- Forbes, W. R. & C. S. Forbes.** 1979. Breeding axolotls in aquaria. *Axolotl Newsletter* 7:23-24.
- Gascon, C., J. O. Collins, R D. Moore, D.R. Church, Mackay, & J. Mendelson III.** 2007. *Amphibian Conservation Action Plan*. IUCN/SSC Amphibian Specialist Group. Gland, Switzerland.
- Gresens, J. B. S.** 2004. An introduction to the Mexican Axólotl (*Ambystoma mexicanum*). *Lab Animal* 33:41-47.
- Halliday, T. R.** 1977. The courtship of European newts: An evolutionary perspective Pp. 185-232. In: *The Reproductive Biology of Amphibians*. D. H. Taylor and S. I. Guttman (eds.), Plenum Press, New York.
- Houck, L. D. & S. J. Arnold.** 2003. Courtship and Mating Behavior. Pp. 383-424. In: Sever D.M. (ed). *Reproductive Biology and Phylogeny of Urodela*. Science Publishers, Inc. Enfield, New Hampshire.
- Houck, L. D. & S. J. Arnold. & N. L. Reagan.** 1990. Male courtship pheromones increase female receptivity in a plethodontid salamander. *Animal Behaviour* 39: 729-734

- Houck, L. D., S. J. Arnold, M. T. Mendoca, K. Lynch & D. E. Scott.** 1996. Courtship behaviour and plasma levels of androgens and corticosterone in male marbled salamanders, *Ambystoma opacum* (Ambystomatidae). *General and Comparative Endocrinology* 104:243–252.
- Houlahan, J. E., C.S. Findlay, B.R. Schmidt, A. H. Meyer & S. L. Kuzmin.** 2000. Quantitative evidence for global amphibian population declines. *Nature* 404: 752–755.
- Huacuz D.** 2001. *Estado actual de los ajolotes del género Ambystoma del lago de Pátzcuaro, Michoacán*. Universidad Autónoma de San Nicolás de Hidalgo de Morelia, Michoacán. 75pp.
- Humphrey, R. R.** 1977. Factors influencing ovulation in the Mexican axolotl as revealed by induced spawnings. *Journal of Experimental Zoology* 199:29-214.
- Kiesecker, J. M., A. R. Blaustein & L. K. Belden.** 2001. Complex causes of amphibian decline. *Nature* 410: 681–684.
- Knudsen, J. W.** 1960. The courtship and egg mass of *Ambystoma gracile* and *Ambystoma macrodactylum*. *Copeia* 1960: 44-46.
- Loredo, I., & D. Van Vuren.** 1996. Reproductive ecology of a population of the tiger salamander. *Copeia* 1996:895-901.
- Mazzi, V. C., D. Vellano, D. Colucci & A. Merlo.** 1974. Structural and functional evolution of gonadotropin-releasing hormone. *General and Comparative Endocrinology* 24:1-9.
- Mccallum, M.** 2007. Amphibian decline or extinction? Current declines dwarf background extinction rate. *Journal of Herpetology* 41: 483–491.
- McCreery, R. & P. Linch.** 1982. The role of androgen in the development of sexual differences in pituitary responsiveness to gonadotropin releasing hormone (GnRH) agonist in the Bullfrog, *Rana catesbeiana*. *General and Comparative Endocrinology* 54:350-359.
- Miltner, M. J. & J. B. Armstrong.** 1983. Spermatogenesis in the Mexican axolotl, *Ambystoma mexicanum*. *Journal of Experimental Zoology* 227:255-263.
- Pavajeau, L. K. C. Zippel, R. Gibson & K. Johnson,** 2008. Amphibian Ark and the 2008 year of the frog Campaign. *International Zoo Yearbook* 42:24-29
- Pounds, J. A. & M. L. Crump.** 1994. Amphibian declines and climate disturbance: the case of the golden toad and the harlequin frog. *Conservation Biology* 8: 72–85.
- Roelants, K., D. J. Gower, M. Wilkinson, S. Loader, S. D. Biju, K. Guillaume, L. Moriau & F. Bossuyt.** 2007. Global patterns of diversification in the history of modern amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104: 887–892.
- Salthe, S. E.** 1969. Reproductive modes and the number and sizes of ova in the Urodeles. *The American Midland Naturalist* 81:467-490.
- Semlitsch, R. D.** 1985. Reproductive strategy of a facultative paedomorphic salamander *Ambystoma talpoideum*. *Ecology* 65:305-313.
- Semlitsch, R. D.** 1987a. Relationship of pond drying to the reproductive success of the salamander *Ambystoma talpoideum*. *Copeia* 1987: 61-69.
- Semlitsch, R. D.** 1987b. Density-dependent growth and fecundity in the paedomorphic salamander *Ambystoma talpoideum*. *Ecology* 68:1003-1008.
- Shaffer, H. B.** 1984. Evolution in a paedomorphic lineage. I. An electrophoresis analysis of the Mexican ambystomatid salamanders. *Evolution* 38:1194-1206.
- Shaffer, H. B. & M. L. McKnight.** 1996. The polytypic species revisited. Genetic differentiation and molecular phylogenetic of the tiger salamander *Ambystoma tigrinum* (Amphibia: Caudata) complex. *Evolution* 50(1): 417-433.
- Shaffer, H. B. & S. R. Voss** 1996. Phylogenetic and mechanistic analysis of a developmentally integrated character complex: alternate life history modes in Ambystomatid salamanders. *American Zoologist* 36:24-35.

- Sever, D. M.** 2003. *Reproductive Biology and Phylogeny of Urodela.*, Science Publishers, Inc., Enfield, New Hampshire.
- Spotila, J. R. & R. J. Beumer.** 1970. The breeding habits of the ringed salamander, *Ambystoma annulatum* (Cope), in Northwestern Arkansas. *The American Midland Naturalist* 84:77-89.
- Stuart, S., J. S. Chanson, N. A. Cox, B. E. Young, A. S. L. Rodrigues, D. L. Fishman, & R. W. Waller.** 2004. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science* 306: 1783–1786.
- Trottier, T. M. & J.B. Armstrong.** 1975. Hormonal stimulation as an aid to artificial insemination in *Ambystoma mexicanum*. *Canadian Journal of Zoology* 56:171-173.
- UICN.** 2008. [http://www.iucn.org/about/work/programmes/species/red\\_list/about\\_the\\_red\\_list/](http://www.iucn.org/about/work/programmes/species/red_list/about_the_red_list/)
- Uribe, A. M. C.** 2001. *Reproductive systems of Caudata Amphibians*. Pp: 267-293. In: H. M. Dutta & J. S. Datta Munshi (Eds.) . *Vertebrate Functional Morphology: A Horizon of New Scientific Approach*. Science Publishers, Inc., Enfield, New Hampshire.
- Uribe, A. M. C.** 2003a. The ovary and oogenesis. Pp. 135-150. In: Sever D.M. (Ed). *Reproductive Biology and Phylogeny of Urodela*. Science Publishers, Inc., Enfield, New Hampshire.
- Uribe, A. M. C.** 2003b. The testes, spermatogenesis and male reproductive ducts. Pp. 151-181. In: Sever D. M. (Ed.), *Reproductive Biology and Phylogeny of Urodela.*, Science Publishers, Inc. Enfield, New Hampshire.
- Verrel, P. A.** 1989. The sexual strategies of natural populations of newts and salamanders. *Herpetologica* 45: 265-282.
- Zerani, M., F.G. Amabili, F. G, Mosconi & A. Gobbetti.** 1991. Effects of captivity stress on plasma steroid levels in the green frog, *Rana esculenta*, during the annual reproductive cycle. *Comparative Biochemistry and Physiology* 98A:491– 496