

De embryonale ontwikkeling van de Alpenwatersalamander gefotografeerd

Ben Geutskens

Het gadeslaan en volgen van de ontwikkeling van embryo's en larven van amfibieën is een boeiende bezigheid. Doordat de eieren van veel amfibieën doorzichtig zijn, is deze ontwikkeling met een microscoop goed zichtbaar. En door van de diverse ontwikkelingsstadia foto's te maken, is er inmiddels van verschillende soorten een bijlvend beeld van dit boeiende schouwspel bij RAVON beschikbaar voor educatieve doeleinden.



Apparatuur en software
Om foto's van de ontwikkeling van embryo tot jonge Alpenwater-salamander (*Mesotriton alpestris*) - zoals in dit artikel - te kunnen maken, is naast een microscoop ook een digitale camera, een goede lichtbron en software om de foto's te bewerken, vereist. De microscoop moet in staat

zijn om samen met de camera scherpe foto's te maken. Het is belangrijk de combinatie van camera en microscoop uit te testen, voordat men tot aanschaf over gaat. Deze foto's zijn gemaakt met een oude Olympus stereomicroscoop type V1-11 met een revolverkop voor vergrotingen van 10x tot 40x. De meest gebruikte

Vrouwje Alpenwatersalamander verpakt met haar achterpoten een ei in de blaadjes van waterpest. (Foto's: Ben Geutskens)

vergroting is 20x. Om vignetting (een rond beeld op een rechthoekig scherm of rechthoekige foto) te voorkomen, wordt er ook via de camera ingezoomd, waardoor de afgeronde hoeken verdwijnen. De uiteindelijke vergroting komt hierdoor hoger uit. Als camera is de Nikon Coolpix 4500 gebruikt. Deze kwalitatief goede en niet al te dure camera is erg geschikt, omdat bij het scherpstellen en zoomen alles wat beweegt in de camera zit. Hierdoor kan je eenvoudig een adapter op de camera schroeven, die aan de andere kant in de tubus van de microscoop kan worden geschroeven. Op deze manier vormen microscoop, adapter en camera één onbeweeglijk geheel.

Nikon stelt via internet informatie beschikbaar over het maken van microscoopfoto's met de Nikon Coolpix 4500. Men adviseert de volgende instellingen: handmatige focus op oneindig, scherpstellen met behulp van de microscoop, lensinstelling 'normaal', in- en uitzoomen om het beeld in de kaderen en diafragma 2.5 tot 4, voor het verkrijgen van veel licht. Het diafragma heeft volgens Nikon nauwelijks of geen invloed op de scherptediepte. Verder moet de camera op kunstlicht worden ingesteld. De foto's in dit artikel zijn gemaakt met een sluitertijd van rond de 1/15 seconde met belichting en diafragma ingesteld op handmatig. Zo kun je zowel met de sluitertijd, het diafragma als met de lichtsterkteknop van de koudelichtbron, een goede belichting verkrijgen.

Nikon stelt via internet informatie beschikbaar over het maken van microscoopfoto's met de Nikon Coolpix 4500. Men adviseert de volgende instellingen: handmatige focus op oneindig, scherpstellen met behulp van de microscoop, lensinstelling 'normaal', in- en uitzoomen om het beeld in de kaderen en diafragma 2.5 tot 4, voor het verkrijgen van veel licht. Het diafragma heeft volgens Nikon nauwelijks of geen invloed op de scherptediepte. Verder moet de camera op kunstlicht worden ingesteld. De foto's in dit artikel zijn gemaakt met een sluitertijd van rond de 1/15 seconde met belichting en diafragma ingesteld op handmatig. Zo kun je zowel met de sluitertijd, het diafragma als met de lichtsterkteknop van de koudelichtbron, een goede belichting verkrijgen.



Dag 3: Neurulatie (3a). Er zijn twee groeven in de gastrula ontstaan, waarheen straks het ruggenmerg met ruggengraat zal worden gevormd. (3b) Door instulping van de neurale plaat vormt zich de neurale groeve, die zich sluit tot de neurale buis. Het proces van de embryogenese is hierna ten einde.

De bediening van de camera gebeurt, om rillingen te vermijden, met de Remote release cord for Coolpix type MCEU1. Op het display van de camera wordt de digitale foto weergegeven. Voor een groter beeld kan de camera worden aangesloten op een TV of computer. Hiervoor zijn speciale kabels beschikbaar (SC-EW3).



Start foetale fase. Dag 4 (4a): Het embryo begint zich te ontwikkelen en ligt hier met de kop naar boven gericht rond de dooier gekromd. (4b) Hier is duidelijk de dikke kop te zien, met - maar beneden gericht - het slanke lichaam.

De juiste belichting is essentieel en 'verrijkt' werkt het beste voor het zien en fotograferen van de details. De Euronex fiber optic light source EK-T is uitgerust met twee afzonderlijke bundels optische vezels, die elk aan het uiteinde een lens hebben waarmee men de lichtbundel inder of minder kan spreiden. Deze lichtbron is daarom zeer geschikt voor het creëren van strijklucht. Bovendien valt dit type lichtbron in de categorie 'koudelicht'. Het is een regelbare sterke lichtbron die geen warmte afgeeft, waardoor het licht geen effect heeft op de embryonale ontwikkeling.

Het probleem van de geringe scherptediepte bij microscoopfoto's is op te lossen door een serie van 10 tot



Foetale fase. Dag 10 (6a): Er is veel gebeurd; de vlektekening wordt zichtbaar en de kleuven beginnen zich te ontwikkelen.



Dag 13 (6b): De vlektekening is intensiever, de kleuven zijn verder ontwikkeld en aan de linker zijde is een van de stabilsotoeren zichtbaar. Daarmee kan het larfje zich laten, buiten het ei, vasthechten als de voorpoten nog niet voldoende ontwikkeld zijn.



Foetale fase. Dag 5 (5a): De ontwikkeling gaat snel; het embryo begint al op een salamander te lijken. Links op de foto is de aanhechting van het ei op het blad te zien. Dag 7 (5b): Hier zijn de herkenbare vormen van een embryo zichtbaar, zoals dat er bij veel diersoorten uitziet. De eerste verontreinigingen zweven in het eiwicht rond. De ogen en voorpoten worden zichtbaar.



De Alpenwatersalamander

De Alpenwatersalamander is een middelgrote watersalamander van maximaal 12 centimeter voor de vrouwtjes en 9 centimeter voor de mannetjes. Deze soort heeft een gedrongen romp met een relatief platte en brede kop en een zijdelingse afgeplatte staart. Mannetjes zijn in de regel wat kleiner en slanker dan vrouwtjes en hebben in de voorplantingstijd een lage kam op de rug en de staart met witte en zwarte banden. De rug is blauwgroen met meestal een zwarte marmertekening, maar bij sommige exemplaren en populaties kan deze helder blauw van kleur zijn. De keel en buik zijn oranje, over het algemeen zonder vlekken, ook bij de vrouwtjes. De staartzoom van de vrouwtjes is minder hoog en de kam op de rug ontbreekt. Ze zijn ook flatter van kleur met vaak een bruinroze marmering. Mannetjes hebben een witte band op de flank, van de snuitpunt tot aan de achterpoten, met zwarte vlekken. Deze band kan ook bij vrouwtjes aanwezig zijn, maar altijd minder opvallend dan bij mannetjes. Op het hand zijn beide geslachten donkerder van kleur, met een meer korrelig huid, en de mannetjes hebben dan geen kam op rug en staart.

De larven worden maximaal vijf tot zes centimeter lang en zijn donker bruin tot zwart van kleur met donkere vlekjes. Er komen ook lichtgekleurde larven voor. De Alpenwatersalamander is binnen zijn Nederlandse verspreidingsgebied doorgraans niet zeldzaam en niet bedreigd (Nollert & Nollert, 2001; Stumpel & Strijbosch, 2006; Creemers & van Delft, 2009).

De Alpenwatersalamander wordt in Europa aangetroffen van het noordwesten (Noord-Frankrijk, België en zuidelijk en oostelijk Nederland) via Noord-Duitsland en het uiterste zuiden van Denemarken tot in Polen en de Oekraïense Karpaten in het oosten, de Balkan in het zuidoosten, noordelijk Italië in het zuiden, Midden-Frankrijk in het zuidwesten, en een gescheiden gebied in de kustzone van noordwestelijk Spanje. In Nederland wordt de Alpenwatersalamander voornamelijk gevonden op de zand-, leem- en blesgronden van Noord-Brabant en Limburg, en daarnaast in Zeeuws-Vlaanderen, het Rijk van Nijmegen en Drenthe. Bovendien is de soort op diverse plaatsen illegaal geïmporteerd, in het laagland, het heuvelland en het middengebied is de soort vooral geïmporteerd aan boegschieden. De



Mannetje Alpenwatersalamander. (Foto: Tonnie Woelfjes)

soort komt in het hooggebergte ook boven de boomgrens voor, tot op 2500 meter hoogte in de Alpen.

De Alpenwatersalamander is een van de eerste amfibieën die in het voorjaar naar het water trekt om zich voort te planten. Als voorplantingshabitat gebruikt ze een grote variëteit aan wateren, zoals karrensporen, grote en kleine poelen en meren, bronnen en venen. Ook in kunstmatige waterbekkens, zoals tuinjvijvers, vindt voorplanting plaats, als er maar bos in de buurt is. De meeste volwassen dieren worden van maart tot en met juni in het water waargenomen. Larven zijn vanaf mei aanwezig en de meeste larven hebben het water in september wel verlaten. Maar dit jaar bijvoorbeeld – na een droog voorjaar en een natte zomer – zijn in de omgeving van Nijmegen tot begin november nog grote aantallen larven in het water gevonden. Buiten het voorplantingswater houden ze zich voornamelijk op onder hout en stenen in loofbossen, maar ook in parken en tuinen. Hier overwinteren ze ook, maar ook in putten en kelders, en soms in het water (Nollert & Nollert, 2001; Stumpel & Strijbosch, 2006; Creemers & van Delft, 2009).

De soort is reeds in 1768 beschreven door Laurent onder de naam *Triton alpestris*. In de daaropvolgende eeuw werd de Alpenwatersalamander vaak ingedeeld in het genus *Molge* Merrem 1820, om in het

begin van de 20^e eeuw ingedeeld te worden bij *Triturus* Rafinesque 1815, samen met alle Europese watersalamanders (Merrens & Weremuth, 1960). Daarmee leek de naamgeving

opgesplitst en werd de Alpenwatersalamander in een eigen genus, *Mesotriton* Bolkaý 1927, ingedeeld (García-París *et al.*, 2004). Daarmee was de naamsverandering echter nog niet ten einde. Josef Schmidler toonde in 2009 namelijk aan, dat de door Laurent in 1768 beschreven *Protetris tritonius*, niets meer was dan de larve van de Alpenwatersalamander. En deze *Protetris tritonius* is in 1801 door Sonnhin en Latreille als type van het genus *Utrichosaura* bestempeld. Dat is de oudste naam en daarom, volgens het prioriteitsbeginsel van de nomenclatuurregels, de juiste. Daarom is volgens Schmidler (2009) de juiste wetenschappelijke naam van de Alpenwatersalamander *Utrichosaura alpestris*, maar dit wordt (nog) niet door iedereen gevolgd. Er zoekt u in de literatuur, met name de oudere, naar gegevens over de Alpenwatersalamander, dan hebt u meer aan de eerdere genoemde namen.

Tonnie Woelfjes (RAVON)

blibli@netkabel.nl

30 foto's van het object te maken met verschillende afsnansinstellingen. Bij het maken van deze foto's is scherpstelling op een punt net iets boven het ei; en voor elke volgende foto is de microscoop iets verder naar beneden gedraaid, in heel kleine stapjes. Dit draaien wordt gestopt niet voorbij het punt waarop het laagste deel van het object scherp wordt afgebeeld. Op de computer kunnen vervolgens alle foto's met behulp van software worden gestackt. Hierbij behoudt het programma van elk beeld dat deel, dat scherp is en het voegt zo de gehele fotoserie tot één enkele scherpe foto samen, nadat het eerste alle beelden heeft uitgelijnd. Dat uitlijnen is nodig omdat bij het scherpstellen het beeld gaat wandelen. Ook is belangrijk dat de foto's in volgorde van boven naar beneden worden gemaakt en niet andersom want anders werkt het stacken niet goed.

Het zal duidelijk zijn dat deze methode omgeschakeld is voor dieren die rondzwemmen of zich anderszins sterk bewegen. Salamanderembryo's zijn meestal vrij, slechts een enkele keer moet een serie opnameuurgemaakt worden, omdat de actieve zijde plotseling in het ei omdraait. Bij klikkracht is dat veel lastiger; reeds vroeg in de ontwikkeling wordt er lustig rond gesparteld in het ei.

De stackingprogramma's Helicon en CombinezP kunnen beide van internet gedownload worden. Helicon kan een paar weken gratis worden uitgeprobeerd, waarna het, bij voortgezet gebruik, moet worden gekocht. Gebeurt dit niet, dan verschijnt prominent de tekst "Helicon" op elke foto.

CombinezP is gratis en maakt gebruik van verschillende algoritmen, waarbij de resultaten sterk van elkaar kunnen verschillen. Het programma biedt de mogelijkheid om in één run op één fotoserie alle algoritmen toe te passen, zodat je steeds de beste foto kunt selecteren. Voor een bepaald type foto is dat vaak hetzelfde algoritme, maar zeker niet altijd. Er zijn uitgeprobeerde mogelijkheden om binnen elk algoritme de waarden van de parameters zelf te kiezen, maar



Foetale fase. Dag 14 (7a): Het embryo groeit snel en de ogen beginnen zich duidelijker af te tekenen. Dag 16 (7b): Het embryo lijkt door een verneveld vensterglas zijn toekomstige wereld in te kijken.

met de fabrieksinstellingen gaat het redelijk goed.

Tot slot moeten de foto's vaak nog nabewerkt worden; om het contrast wat te verhogen, de kleuren aan te passen, maar vooral om ongewenste verontreinigingen, zoals in het water zwevende veldedijtes, weg te kloeren. Hiervoor zijn veel fotobewerkingsprogramma's te koop, zoals Photoshop en Paint Shop Pro, of gratis van internet te downloaden.

Het fotograferen

Om tijdig over het juiste materiaal te beschikken, zijn in het najaar uit mijn vijver een drietal Alpenwatersalamanders gevangen, een mannetje en twee vrouwtjes. Deze hebben binnehuis in een terrarium met ruim water en een landgedeelte overwinterd. Let op; hiervoor is een ontferming op de Flora- en faunawet nodig (voor meer informatie zie www.ravon.nl).

Op deze wijze is te volgen wanneer de paring begint en wanneer de eerste eizetel plaatsvindt (in dit geval begin februari). De delen van waterplanten waarop een of meerdere eieren zaten vastgeplakt, zijn afgeknipt en in een glasje potje in het aquariumwater gehangen. Hierdoor is het mogelijk elke dag een of meerdere takjes met een pinnet uit de pot te vissen en over te brengen in een petrischaal om te fotograferen. Het water in de pot werd dagelijks ververst.

Het is zaak om meerdere eieren

te hebben, omdat niet elk ei even goed zicht geeft op zijn bewoner, bijvoorbeeld doordat het ei is

ontstoten door de blaadjes van een waterplant. De plantendelen moeten niet te klein zijn; zij dienen voor de stabiliteit van het object, zodat bewegingsonscherpte vermeden wordt.

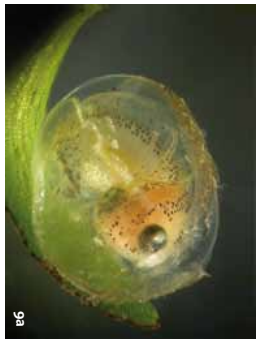
De foto's

De foto's die in dit artikel zijn opgenomen, geven een goed beeld van de embryonale ontwikkeling van de Alpenwatersalamander in een periode van 23 dagen. In de bijgeschreven bij de foto's wordt duidelijk aangegeven wat er op de foto te zien is en welke stadia worden doorlopen.



Foetale fase. Dag 17 (8): De ei-membranen worden steeds minder doorzichtig en de buitenste is bijna geheel craquelé geworden. De ogen van het dierje zijn nog verder ontwikkeld en de rechter stabilisator is duidelijk zichtbaar. Het dierje wordt ook wat bewegelijker en draait zich zo nu en dan geheel om binnen het ei.





Foetale fase. Dag 21 (9a). Het ei is aan de buitenzijde al aardig wul geworden en beschadigd. Binnen in het ei zijn duidelijk de rondzwevende verontreinigingen in de vorm van witte slierten en klonters te zien. De kieuwen zijn al goed ontwikkeld en door de microscoop zijn de bloedlichaampjes daarin duidelijk te zien; ze bewegen in lange rijen met de regelmaat van de hartslag schotsgewijs door de nauwe aderen en slagaderen, waar ze maar net door lijken te kunnen. Als het dierje zijn buik toont, kun je ook het hart duidelijk zien kloppen. (9b) Soms laat het ei door het gespaat vel van het embryo los van het blad; het zit er verfromtaald uit en heeft zijn werk gedaan.

Helaas zijn er geen foto's van een zeer vres Alpenwatersalamander waar de kleving in tweeën, vieren, achten enzovoort nog niet of nog maar net is opgetreden. Zulke foto's zijn wel beschikbaar van eieren van de bruine kikker (*Rana temporaria*) en groene kikker (*Rana esculenta* synklepton). Bij hoge temperaturen gaat de embryonale ontwikkeling sneller en niet alle foto's zijn van hetzelfde dier, zodat de eieren op verschillende dagen kunnen zijn afgezet. Het aangegeven aantal dagen in de ontwikkeling is daarom een indicatie.

Summary

This article explains the combined use of a camera, flash and microscope to make pictures of the developmental stages of amphibian eggs. The use of software to stack pictures and enhance their quality is discussed. Illustrations of various stages, such as the moula, blastula and gastrula, are mainly based on the eggs of the Alpine newt (*Mesotriton alpestris*).

Literatuur

- Bolkay, S.L.L., 1927. Materialien zu einer vergleichenden Morphologie der Carpal- und Tarsalelemente der Unterfamilie Salamandrinae. Glasnik Zemaljskog Muzeja u Bosni i Hercegovini, Sarajevo 39: 59-67.
- Creemers, R.C.M. & J.J.C.W. van Delt (RAVON) (redactie), 2009. De amfibieën en reptielen van Nederland. Nederlandse Fauna 9. Nationaal Natuurhistorisch Museum Naturalis, European Invertebrate Survey - Nederland, Leiden.
- García-París, M., A. Montori & P. Herrero, 2004. Amphibia. Lissamphibia. Museo Nacional de Ciencias Naturales & Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid.
- Mertens, R. & H. Wermuth, 1960. Die Amphibien und Reptilien Europas (Dritte List, nach dem Stand vom 1. Januar 1960). Verlag Waldemar Kramer, Frankfurt am Main.
- Nöllert, A. & C. Nöllert, 2001. Amphibienris van Europa. Tiron Uitgevers BV, Baarn.
- Schmidler, J.F., 2009. *Ichthyosaura*, der neue Gattungsname für den Bergmolch- en Leihboenspiel in Sachen Nomenklatur. Zeitschrift für Feldherpetologie 16: 245-250.
- Stumpel, A.H.J. & H. Strijbosch, 2006. Valdigde amfibieën en reptielen. KNNV Uitgeverij, Utrecht.
- <http://nl.wikipedia.org/wiki/Embryogenese>
- <http://www.luc.edu/faculty/wwasser/dev/devm.htm>
- http://nl.koninkroepje.nl/cas/help.com/app/answers/detail/a_id/3006

Ben Geutskens

Merehof 27
9933 KL Norg
bgeutskens@ccnet.nl



Foetale fase. Dag 21 (10a). Twee broertjes of zusjes, nog in het ei op het zelfde takje waterpest vastgeplakt. De ei-membranen van het bovenste ei zijn al opengescheurd, waardoor het embryo niet langer de bescherming geniet waaraan het gewend is. (10b) Hier steekt de kleine zijn kop al naar buiten en zal zo dadelijk de wijde wereld in zwemmen. Het is geen embryo meer, maar een larve.



Larvale fase. Dag 23 (12). Een close up van de kop met vlak bij de ogen de beide stablilatoren met aan het uiteinde de hechtorganen, die evenals de uitwendige kieuwen, later zullen verdwijnen. In de kop zijn de bloedlichaampjes waarneembaar, stromend door het vaatstelsel van de kieuwen.



Een paar weken later (13): De larve is de hele dag op jacht naar kleine kreeftachtigen en ander klein spul en is flink gegroeid. De stablilatoren zijn verdwenen, de kieuwen zijn gegroeid en het dier heeft nu vier potten.



Larvale fase.
Dag 22: (11a) Een leeg ei, waar zojuist het larfje uitgekropen is.
Dag 23 (11b): Een net uit het ei gekropen larfje. Voor het eerst kan het zich strekken.

Stadia embryogenese bij amfibieën globaal weergegeven (Bron: Wikipeedia)

1. Zygote: bevruchte eicel
2. Morula: kleving (celdeling waarbij volume embryo niet toeneemt)
3. Blastula: vorming holte en begin differentiatie cellen
4. Gastrulatie: via de vorming van de oermond wordt het maag-darmkanaal gevormd
5. Neuralie: vrouwen neurale plaat tot neurale buis (ruggenmerg) en vorming spieren, skelet en huid
6. Foetale fase: groei embryo en vorming organen



De vroegste ontwikkelingsstadia van een amfibieënet. In dit geval van een groene kikker. Boven de kleving in vier gelijke delen.

Na de metamorfose (14): De kieuwen zijn verdwenen, de huid is droog geworden en hij is het land opgegaan. Juvenile Alpenwatersalamanders hebben soms een kenmerkende oranje streep op hun rug.

