

Variatie van addergif in Nederland

René Broek & Albertjan ter Heide

In 2015 en 2016 hebben maar liefst 82 stagiaires een stage uitgevoerd voor RAVON. In dit artikel een kijkje achter de schermen van 2 stagiaires die voor de Werkgroep Adderonderzoek Nederland (WAN) onderzoek hebben verricht naar addergif. De samenstelling van addergif is grotendeels bekend. Bij een aantal slangensoorten is in het gif verschil aangetoond tussen individuen uit verschillende populaties. Maar is dit ook het geval bij de adder (*Vipera berus*) in Nederland? Om dit te achterhalen is addergif verzameld in het Leggelderveld, Fochteloërveen, Gortelsche Heide en De Meinweg.

In samenwerking met Werkgroep Adderonderzoek Nederland (WAN), Hogeschool Van Hall Larenstein en Universiteit Leiden hebben de auteurs onderzoek gedaan naar de variatie in addergif uit vier verschillende gebieden in Nederland. Gif is een vloeistof welke voornamelijk bestaat uit eiwitten en peptiden met ieder hun eigen functie, bijvoorbeeld bloedverdunnend of verlamkend (Casewell *et al.*, 2013). Slangen gebruiken hun gif ter verdediging of om hun prooi te immobiliseren en te doden (Rocha, 2016). De samenstelling van het gif van de adder is grotendeels bekend. Bij diverse soorten slangen zijn er verschillen aangetoond tussen individuen uit verschillende populaties (Chippaux *et al.*, 1991; Daltry *et al.*, 1996) en de belangrijkste onderzoeksvraag voor dit onderzoek was uit te zoeken of dit ook het geval is bij de adder in een klein gebied als Nederland.

Onderzoekspopulaties

Om de variatie in addergif te kunnen onderzoeken is er uiteraard gif nodig. De leefgebieden waar het gif van de adder is verzameld zijn het

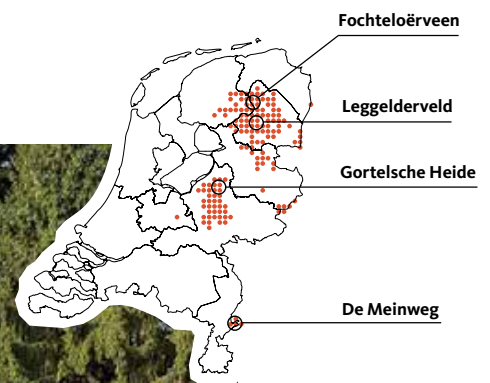
Leggelderveld, Fochteloërveen, Gortelsche Heide en De Meinweg. Deze gebieden zijn gekozen omdat dit gebieden zijn waar de WAN populatieonderzoek verricht en omdat deze gebieden verspreid over Nederland liggen, zie figuur 1. Het vangen en hanteren/fixeren van adders brengt stress met zich mee voor het dier. Door aan te sluiten bij de onderzoekers van de WAN was het niet nodig om dieren meerdere keren te vangen en konden alle handelingen (verzamelen monitoringgegevens en verzamelen gif) achter elkaar worden uitgevoerd.

Verkrijgen van gif

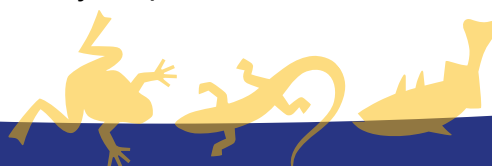
Voor het vangen en fixeren van de adders zijn handschoenen (Hexarmor handschoenen van Kevlar) gebruikt waar adders niet



Op zoek naar adders in Nationaal Park De Meinweg. (Foto: Pedro Janssen)



Figuur 1. Onderzoekgebieden in Nederland.



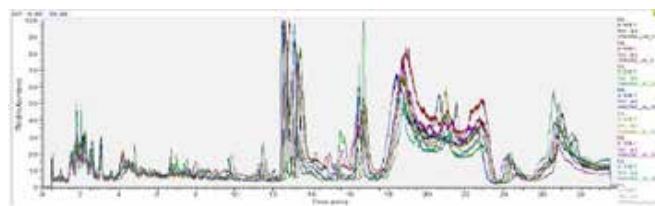


Adder die gemolken wordt met een druppel gif duidelijk zichtbaar in het opvangpotje. (Foto: Johann Prescher)

doorheen kunnen bijten. De adders zijn gemolken door ze te fixeren en vervolgens door een Parafilm afdekkfolie heen te laten bijten. Het Parafilm zat over een bevochtigd opvangpotje heen gespannen waarin het gif is opgevangen. Dit potje wordt bevochtigd zodat bij een kleine hoeveelheid gif het makkelijker is om uit te pipeteren. Dit gif is met behulp van een pipet vanuit het opvangpotje in een Eppendorftube (klein plastic buisje) gedaan. Deze Eppendorftubes zijn zo snel mogelijk in vloeibare stikstof opgeslagen om degeneratie van het gif te voorkomen. Het gif is vanuit de vloeibare stikstof tijdelijk opgeslagen op -80°C waarna het gif gevriesdroogd is. Vervolgens is de droge stof van het gif weer opgeslagen op -80°C .

Analysen van het gif

Het gif is geanalyseerd met behulp van een massaspectrometer dat eiwitten en peptiden op basis van massa scheidt. Het gif wordt geïnjecteerd in de spectrometer waarna de eiwitten en peptiden met elektronen worden beladen. Deze geladen eiwitten en peptiden worden geselecteerd in het massafilter door een magnetisch veld. Alle eiwitten en peptiden worden geregistreerd en weergegeven in een spectrogram (zie figuur 2). Dr. Mladic van Universiteit Leiden heeft geholpen met het instellen van de apparatuur en het verkrijgen van de spectrogrammen. De massaspectrums zijn met elkaar vergeleken op



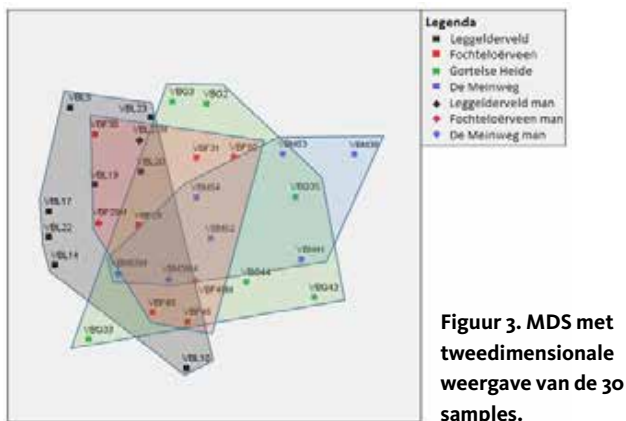
Figuur 2. Spectrogram van addergif. Met behulp van een massaspectrometer zijn 30 samples geanalyseerd waarbij de massaspectrums met elkaar zijn vergeleken op onderlinge verschillen in basepieken.

onderlinge verschillen in basepieken (de pieken die het meest verklarend zijn). Deze verschillen zijn met behulp van een Multidimensional Scaling (MDS), in het statistiekprogramma SPSS, twee dimensionaal weergegeven. Om te zien of er een significant verschil is tussen de vier populaties is een Oneway Anova en een Post Hoc Toets uitgevoerd.

Resultaten

Tijdens het onderzoek zijn er in totaal 55 adders gemolken. Omdat er met de gebruikte methode minimaal 1 milligram gevriesdroogd gif





Figuur 3. MDS met tweedimensionale weergave van de 30 samples.

nodig is om te kunnen analyseren konden niet alle samples geanalyseerd worden. Er zijn in totaal 30 samples geanalyseerd, bestaande uit 25 adulte vrouwen en 5 adulte mannen. Door het lage aantal samples van mannen kan hier niets uit geconcludeerd worden. Alle samples van juveniele adders voldeden niet aan de minimale samplegrootte. In figuur 3 is de Multidimensional Scaling weergegeven. De MDS laat tweedimensionaal zien in hoeverre het gif met elkaar overeenkomt. Elk teken staat voor een individuele adder, hoe dichter de tekens bij elkaar staan hoe meer het gif met elkaar overeenkomt. De vlakken geven aan tot welk gebied deze adders behoren. Te zien is dat er tussen de gebieden De Meinweg en Leggelderveld nauwelijks overlap is. Dit betekent dat het gif uit deze gebieden het meest verschilt.

Conclusie

Het gif van elke slang is anders. Sommige individuen hebben bepaalde eiwitten juist wel of niet. Het is een studie op zich om te kijken wat deze eiwitten precies doen en waarom een individu deze wel/niet heeft. Helaas waren hier de tijd en middelen niet voor, maar daar zou in de toekomst nog naar gekeken kunnen worden. Er zijn bij dit onderzoek geen significante verschillen aangetoond, omdat de overeenkomsten tussen het gif van de individuen te groot was.

Dankwoord

Graag willen we de volgende mensen bedanken voor hun bijdrage aan

dit onderzoek: Jelmer Groen, Johann Prescher, Peter Keijzers, Frank Heinen, Yvonne Radstake, Ton Lenders, Mark van Andel en in het bijzonder Pedro Janssen van Werkgroep Adderonderzoek Nederland. Ook bedanken wij de gebiedsbeheerders van Staatsbosbeheer, Kroondomein Het Loo en Natuurmonumenten voor het verlenen van de toestemming om in het gebied adders te mogen vangen. We bedanken RAVON voor het verlenen van de ontheffing Flora- & faunawet. We bedanken Harald Kerckamp, Freek Vonk, Marija Mladic en Michael Richardson van Universiteit Leiden voor het beschikbaarstellen van materialen en het laboratorium.

Summary

Variation in adder venom in the Netherlands

Venom is a liquid that mainly consists of proteins and peptides with each their individual function. Snakes use their venom to immobilise and kill prey. Intraspecific differences in venom composition are seen within a species including the Adder (*Vipera berus*). In this study we investigated if there are differences between four populations of adders in the Netherlands. The areas where the venom samples were collected are Leggelderveld, Fochteloërveen, Gortelsche Heide and De Meinweg. The venom samples were analysed with the use of a mass spectrometer. The mass spectra data were compared with each other on differences in base peaks. In total 30 samples were analysed and the results show that there are differences in venom composition but that these differences are not statistically significant. Further research will try to ascertain if there are area specific proteins or peptides in the venom from the adder in the Netherlands.

Literatuur

- Casewell, N.R., W. Wüster, F.J. Vonk, R.A. Harrison & B.G. Fry, 2013. Complex cocktails: the evolutionary novelty of venoms. *Trends in Ecology & Evolution* 28(4): 219–229.
- Chippaux, J.P., V. Williams, & J. White, 1991. Snake Venom Variability: Methods of Study, results and interpretation. *North* 11: 1279–1303.
- Daltry, J.C., W. Wuster, & R.S. Thorpe, 1996. Diet and snake venom evolution. *Nature* 379: 537–540.
- Rocha, L.F.O., 2016. Analysis of molecular structures and mechanisms for toxins derived from venomous animals. *Computational Biology and Chemistry* 61: 8–14.

René Broek

renebroek@msn.com

Albertjan ter Heide

albertjanterheide@live.nl

Albertjan ter Heide en René Broek tijdens het melken van een adder.
(Foto: Johann Prescher)

