Feitenrelaas rondom *Pituophis*-waarnemingen uit de duinen tussen Scheveningen en Katwijk

Richard P.J.H. Struijk

RAVON

Feitenrelaas rondom *Pituophis*-waarnemingen uit de duinen tussen Scheveningen en Katwijk

Richard P.J.H. Struijk

M.m.v. Kees van Bochove (Datura Molecular Solutions BV.), Noël Aarts (Dunea), Walter Getreuer (ReptielenZOO “SERPO”) & A. Martel (Universiteit Gent)

Colofon

Rapportnummer:	2017.038
Datum uitgave:	16-3-2018
Titel:	Feitenrelaas rondom *Pituophis*-waarnemingen uit de kustduinen tussen Scheveningen en Katwijk
Wijze van citeren:	Struijk, R.P.J.H., 2018. Feitenrelaas rondom *Pituophis*-waarnemingen uit de duinen tussen Scheveningen en Katwijk. Stichting RAVON, Nijmegen: 28 pp.
Samenstellers:	Richard P.J.H. Struijk
Foto's omslag:	Noël Aarts & R. Struijk
Aantal pagina's incl. bijlagen:	28
Projectnummer:	2017.038
Projectleider:	Richard P.J.H. Struijk
Naam en adres opdrachtgever(s):	Bureau Risicobeoordeling & onderzoeksprogrammering Catharijnesingel 59 Postbus 43006 3540 AA Utrecht
Referentie opdrachtgever(s):	60017981
Akkoord voor uitgave:	Jeroen van Delft
Paraaf:	

© 2018 Stichting RAVON, Nijmegen

Inhoud

1 Inleiding 1

2 Leeswijzer 2

3 *Pituophis*-waarnemingen 3
- 3.1 Methode 3
- 3.2 Resultaten 3
- 3.3 Discussie 6
- 3.4 Conclusie 7

4 Taxonomische status 9
- 4.1 Methode 9
- 4.2 Resultaten 10
- 4.3 Discussie 11
- 4.4 Conclusie 12

5 Dieet 13
- 5.1 Methode 13
- 5.2 Resultaten 13
- 5.3 Discussie 14
- 5.4 Conclusie 15

6 Voortplanting 16
- 6.1 Methode 16
- 6.2 Resultaten 16
- 6.3 Discussie 17
- 6.4 Conclusie 17

7 'Snake fungal disease' (*Ophidiomyces ophiodiicola*) 18
- 7.1 Methode 18
- 7.2 Resultaten 18
- 7.3 Discussie 18
- 7.4 Conclusie 18

8 Conclusie en aanbevelingen 19

9 Dankwoord 21

10 Literatuur 22

Bijlage 1. Waarnemingen van *Pituophis* spec. in de duinen tussen Scheveningen en Katwijk 26

Bijlage 2. Laboratoriumanalyse – prooidieren metabarcoding 27

Bijlage 3. Resultaten prooianalyse metabarcoding 28

1 Inleiding

Het geslacht *Pituophis* bevat zeven soorten, namelijk *P. catenifer*, *P. melanoleucus*, *P. ruthveni*, *P. deppei, P. lineaticollis*, *P. insulanus* en *P. vertebralis* (IUCN; Reptile-database.org). In totaal worden 14 ondersoorten erkend (Reptile-database.org). Dieren van dit geslacht zijn robuust gebouwd en niet giftig. De lengte varieert naar gelang de (onder)soort van 0,9-2 meter met uitschieters naar 2,75 meter (Hirschkorn & Skubowius, 2011). Alle soorten worden in gevangenschap gehouden, waarbij *Pituophis catenifer* ssp. ('gofferslangen') en *Pituophis melanoleucus* ssp. ('pijnboomslangen') het meest frequent worden gehouden en deze komen ook betrekkelijk eenvoudig tot voortplanting (Hirschkorn, 1986; Bergadá, 1998; Bronsgeest, 1998; Skubowius, 2007; Hirschkorn & Skubowius, 2011).

In de in 2014 gepubliceerde risicoanalyse 'Uitheemse slangen in Nederland' (Bugter *et al.*, 2014), worden de risico's van veel uitheemse slangensoorten in beeld gebracht. Ook de "stierslang" (*Pituophis catenifer*) (maar zie voor naamgeving hoofdstuk 2) wordt behandeld. Geconcludeerd is dat er een lage ecologische impact wordt verwacht en de soort dus geen gevaar vormt voor de inheemse biodiversiteit (ISEIA-score=6). Echter, vanaf 2013 zijn in de Zuid-Hollandse duinen tussen Scheveningen en Katwijk steeds frequenter waarnemingen van dieren van het geslacht *Pituophis* gedaan. RAVON en Dunea hebben sinds 2015 de waarnemingen geregistreerd en op basis daarvan werd duidelijk dat deze niet van incidentele aard waren. Aanvankelijk ging het om enkele waarnemingen, maar het aantal is vanaf 2015 sterk toegenomen. Bovendien kwamen enkele aspecten aan het licht die er op duiden, dat de soort zich mogelijk beter aan weet te passen dan werd verondersteld door Bugter *et al.* (2014). Het Bureau Risicobeoordeling en Onderzoeksprogrammering van de Nederlandse Voedsel- en Warenautoriteit heeft RAVON gevraagd een feitenrelaas op te stellen van nieuwe waarnemingen in de Zuid-Hollandse duinen.

Figuur 1: *Pituophis* spec. in de duinen bij Scheveningen (Foto: R. Struijk)

2 Leeswijzer

Binnen onderhavige rapportage komt een groter aantal onderwerpen aan bod. Voor een optimale leesbaarheid, is er voor gekozen om ieder onderwerp in een apart hoofdstuk te behandelen. Binnen de hoofdstukken wordt de traditionele indeling (methode, resultaten en discussie) wel aangehouden.

Uit het onderzoek naar de taxonomische status van de verschillende aangetroffen slangen is gebleken dat het *Pituophis*-hybriden betreft (zie H4). Zelfs ogenschijnlijk zuivere dieren bleken hybriden te zijn. Om deze reden wordt in onderhavige rapportage gesproken over dieren uit het geslacht *Pituophis* (veelal aangeduid als '*Pituophis* spec.'). Dit voorkomt verwarring in vergelijking met het gebruik van een hybride-aanduidingen of de triviale naamgeving. Deze laatste leidt binnen het geslacht ook dikwijls tot verwarring. Zo is de Nederlandstalige triviale naam 'stierslang' enkel van toepassing op één ondersoort van het *Pituophis catenifer* complex, namelijk *P. c. sayi*. Alle overige *P. catenifer* ondersoorten worden in de volksmond gofferslang genoemd, al dan niet met voorvoegsel naar gelang de ondersoort. Dat dit verwarrend kan zijn, blijkt onder andere uit de in 2014 verschenen risicoanalyse voor uitheemse slangen in Nederland (Bugter *et al.*, 2014) waar de triviale naam stierslang aan de wetenschappelijke naam *Pituophis catenifer* is gekoppeld.

3 *Pituophis*-waarnemingen

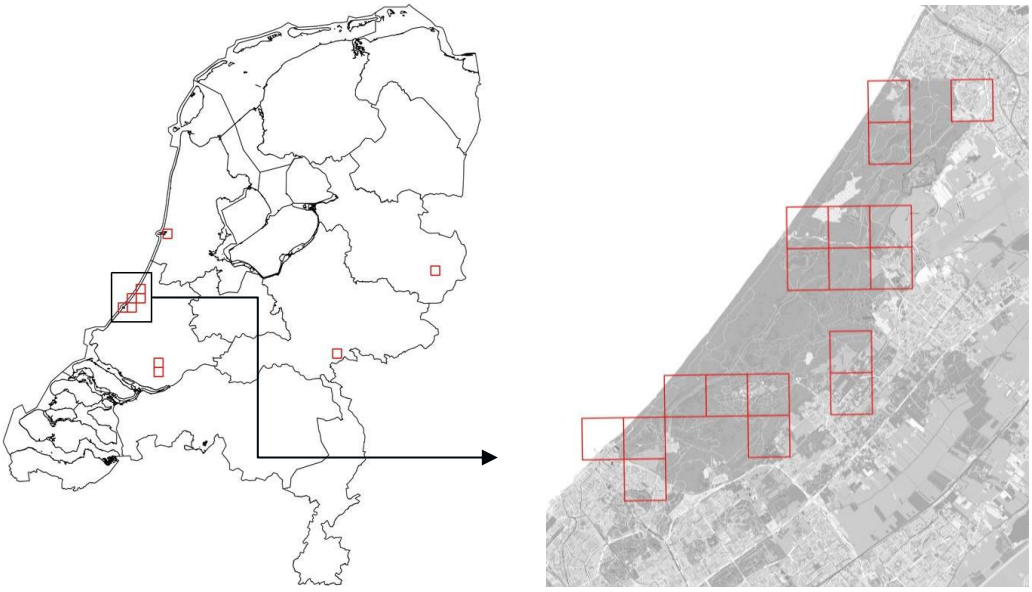
3.1 Methode

Bij het verzamelen van slangenwaarnemingen uit de Zuid-Hollandse duinen is volledig ingezet op de waarnemingen van het brede publiek; er is derhalve geen veldwerk verricht. Meldingen zijn verkregen via terreinbeheerders, politie, burgers, online media, social media (met name Facebook), dierenambulances en ReptielenZOO "SERPO". Iedere melding is op betrouwbaarheid beoordeeld, waarbij onderscheid is gemaakt in *zekere*, *waarschijnlijke*, *onzekere* en *onbetrouwbare Pituophis*-waarnemingen. De criteria zoals geformuleerd door Struijk & van Leeningen (2017) zijn hiervoor gehanteerd. Voor waarnemingen buiten de Zuid-Hollandse duinen is gebruik gemaakt van online zoekmachines en contacten binnen de terrariumhobby.
Van iedere waarneming zijn de datum, tijdstip en exacte vindplaats (coördinaten) genoteerd en is, indien mogelijk, beeldmateriaal verzameld. Van dieren die beschikbaar waren (dood of levend), zijn tevens de afmetingen (kop-cloaca- en staartlengte) en het gewicht vastgesteld. Alle waarnemingen waarvan beeldmateriaal beschikbaar was, zijn met elkaar vergeleken, om te bepalen of het om verschillende of dezelfde dieren gaat. Wanneer individuele dieren meermaals zijn waargenomen, zijn de verplaatsingen in kaart gebracht en is bekeken of er sprake is geweest van overwintering. Omdat het verkregen beeldmateriaal van kwaliteit wisselt en dieren dikwijls van afwijkende kanten zijn gefotografeerd of gefilmd, is een vergelijking niet altijd goed mogelijk. Alleen 100% zekere hervangsten zijn als zodanig beschouwd. Ook zijn dode dieren verzameld en ingevroren voor aanvullende onderzoekdoeleinden.
Bij de data-analyse zijn enkel de *zekere* en *waarschijnlijke Pituophis*-waarnemingen gebruikt.

3.2 Resultaten

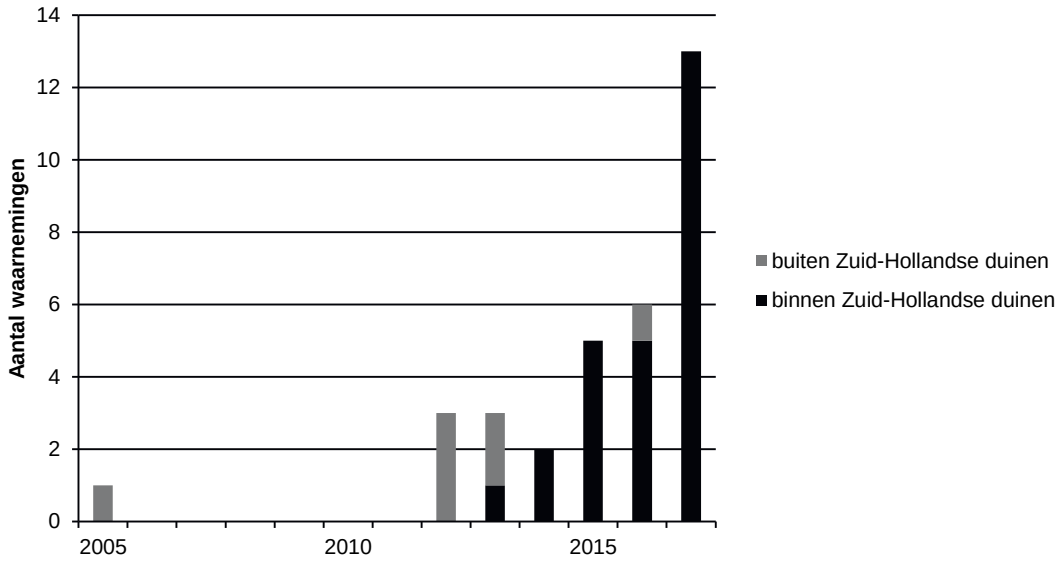
Waarnemingen van *Pituophis* spec. in Nederland zijn uit tenminste vier provincies bekend: Zuid-Holland, Noord-Holland, Gelderland en Overijssel. Het zwaartepunt van waarnemingen bevindt zich in de duinstrook tussen Katwijk en Scheveningen. Hier zijn vanaf 2013 tenminste 28 waarnemingen van slangen gedaan. Van 25 waarnemingen waren één of meerdere foto's/filmpjes of het dier zelf (dood of levend) beschikbaar voor determinatie. In al deze gevallen betrof het *zekere* waarnemingen van een *Pituophis* spec. Daarnaast is één *waarschijnlijke* waarneming gedaan waarbij fotomateriaal ontbreekt. Op basis van de gedetailleerde en duidelijke beschrijving door de waarnemer, het korte tijdsbestek (ca. 35 minuten) tussen het moment van waarnemen en het moment van interviewen van de waarnemer en de overtuigende herkenning van getoond fotomateriaal, wordt de waarneming als *waarschijnlijk* beschouwd. Bij een waarneming van een slang nabij Katwijk op 6-8-2017 ontbrak eveneens fotomateriaal. Aangezien de omschrijving door de waarnemer niet eenduidig wees op een *Pituophis* spec. is deze als *onzeker* beschouwd. Ditzelfde geldt voor een incomplete vervellingshuid die op 16-11-2017 in de duinen bij Katwijk is gevonden; (cruciale) determinatiekenmerken zoals de kopschilden rostrale, nasale, internasale en prefrontale ontbreken. Beide *onzekere*

waarnemingen zijn niet in de analyse meegenomen. Er zijn dus 26 betrouwbare *Pituophis*-waarnemingen gedaan. Deze liggen verspreid over vijf uurhokken en 18 kilometerhokken (figuren 2 & 3). Nagenoeg alle waarnemingen in de Zuid-Hollandse duinen zijn gedaan in de natuurgebieden Meijendel en Berkheide, gelegen tussen Scheveningen en Katwijk (figuur 9). Slechts drie exemplaren zijn buiten de grenzen van deze natuurgebieden aangetroffen, alle drie in woonwijken vlak tegen de duinrand aan. De waarnemingen reiken zodoende van de wijk 'Oostduinen' (Scheveningen) in het zuiden tot 'Zanderij' (Katwijk) in het noorden en 'De Kieviet' (Wassenaar) in het oosten. Een totaaloverzicht van alle waarnemingen is in bijlage 1 opgenomen.



Figuren 2 & 3: verspreiding van *Pituophis*-waarnemingen in Nederland op uurhokniveau (links) en op kilometerhokniveau (rechts) in de duinen Scheveningen – Katwijk.

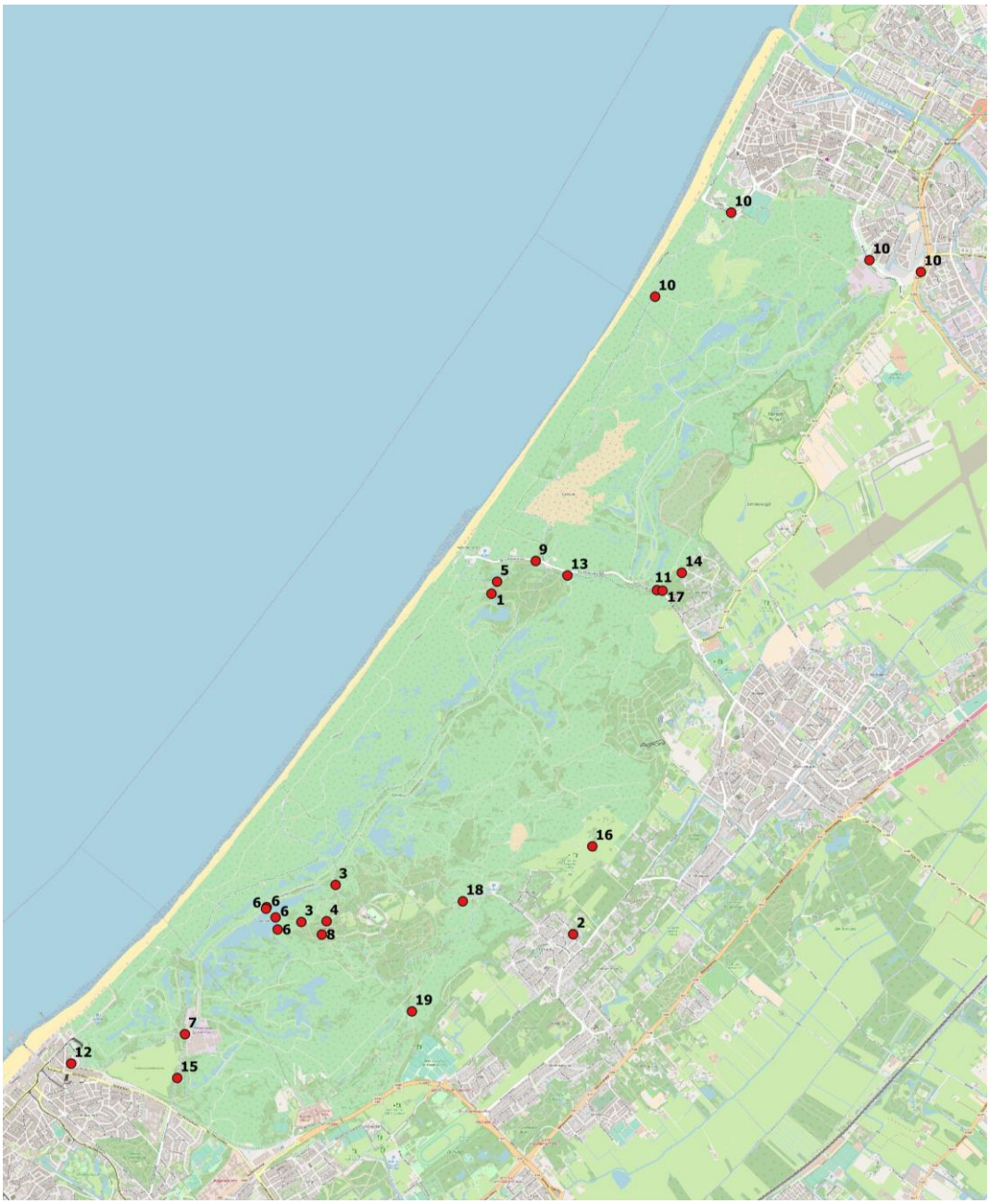
Buiten de Zuid-Hollandse duinen zijn in Hengelo (2005), IJmuiden (2012), Puttershoek (2013; 2x) en Hulshuizen (2016) *Pituophis* spec. aangetroffen. Met uitzondering van Puttershoek, betrof het in deze gemeenten eenmalige vondsten die zijn verwijderd en opgevangen. De dieren in Puttershoek zijn op circa 0,5-1 kilometer afstand van elkaar gevonden, één in het buitengebied en één in de dorpskern. De vijf hier genoemde warnemingen buiten de duinen van Zuid-Holland, vormen geen compleet overzicht van alle in het wild aangetroffen *Pituophis* spec. in Nederland. De database van ReptielenZOO "SERPO" leert, dat zij het afgelopen decennium nog enkele dieren hebben opgevangen, waarvan de exacte vindplaats onbekend is. Hoogstwaarschijnlijk worden ook niet alle *Pituophis*-waarnemingen in Nederland geregistreerd en worden slangen bijvoorbeeld door dierenambulances naar lokale een dierenopvangcentra of terrariumhouders overgebracht.
Het jaarlijks aantal waarnemingen vanaf 2013 vertoont een stijgende lijn met een duidelijke piek in 2017 (figuur 4).



Figuur 4: Aantal geregistreerde *Pituophis*-waarnemingen in de Zuid-Hollandse duinen en elders in Nederland.

In totaal zijn 26 betrouwbare *Pituophis*-waarnemingen geregistreerd. Door middel van fotovergelijking is vastgesteld dat drie exemplaren meer dan eenmaal zijn waargenomen; twee exemplaren zijn zelfs viermaal waargenomen. Vanwege de wisselende fotokwaliteit en wisselende invalshoek van de foto's, konden niet alle waarnemingen goed onderling worden vergeleken. De kans bestaat dat er meer hervangsten zijn maar dat deze om eerder genoemde oorzaken niet met zekerheid herleid kunnen worden. Dit betekent dat (maximaal) 19 zekere *Pituophis* spec. in de duinen zijn waargenomen. Daarvan zijn er vier dood op wegen of paden aangetroffen ('dead on road'; DOR), zes verwijderd en in ReptielenZOO "SERPO" opgevangen en de overige negen zijn niet verwijderd en zijn dus mogelijk nog levend in de duinen aanwezig. Dit aantal moet als ondergrens worden beschouwd, aangezien het aannemelijk is dat niet alle werkelijk aanwezige dieren ook zijn waargenomen en geregistreerd.

Figuren 5 t/m 8: Verkregen foto's van dier P10 op vier verschillende dagen (v.l.b.n.r.: 14-5-2017 (Foto: T. van der Plas); 22-5-2017 (Foto: J. Denkers); 23-5-2017 (Foto: C. de Kreek); 25-5-2017 (Foto: G. Akerboom, politie Katwijk).



Figuur 9: Vindplaatsen van *Pituophis* spec. in de duinen tussen Scheveningen en Katwijk (individu-nummers corresponderen met bijlage 1).

3.3 Discussie

Vanwege het hoge aantal waargenomen *Pituophis* spec. mag worden verondersteld dat de wijze van introductie hier een bewuste betreft, vanuit gevangenschap. Of het een eenmalige of herhaaldelijke introductie betreft, is onduidelijk. Gezien de toename in het aantal waarnemingen én het feit dat concrete aanwijzingen voor succesvolle voortplanting ontbreken (zie H6), lijkt het reëel te veronderstellen dat het om meerdere introducties in de tijd gaat. De toegenomen media-aandacht kan ertoe hebben geleid dat mensen hun waarneming eerder melden, waardoor het aantal meldingen in de loop der tijd toeneemt. Met name in 2017 is er veel aandacht voor de soort geweest. Dat jaar telt ook de meeste meldingen, namelijk 13 (50% van het totaal).

Uit de registraties van dieren die meerdere malen zijn waargenomen, valt af te leiden dat twee daarvan succesvol in de duinen hebben overwinterd. Zij werden voor én na de winter waargenomen. Een van deze twee dieren (P06) werd in het voorjaar van 2016 bij een hol aangetroffen, mogelijk dat dit de overwinteringslocatie is geweest. Van nature overwinteren *Pituophis* spec. veelal in holen (Gerald *et al.*, 2006; Miller, 2008; Burger & Zappalorti, 2011). Vanwege de nauwkeurige locatiebepaling kunnen van de drie meermaals waargenomen individuen ook afgelegde afstanden worden bepaald. Deze afstanden bedragen respectievelijk 529 meter (P03; interval 374 dagen), 395 meter (P06; interval 339 dagen) en 4019 meter (P10; interval 11 dagen). Verplaatsingen van deze drie dieren zijn in de figuren 10-12 weergegeven.

Diverse onderzoeken bieden inzicht in de home ranges van diverse *Pituophis*-soorten en ondersoorten. Home ranges kunnen zeer beperkt zijn (<1 ha.), maar kunnen oplopen tot meer dan 80 ha. (zie overzicht van verschillende studies in Kapfer *et al.*, 2008; Rodríguez-Robles, 2003; Miller, 2008; Gardiner, 2012). Hoewel op basis van de beschikbare data geen home range bepalingen mogelijk zijn, kan gerust worden gesteld dat de verplaatsingen van P10 spectaculair zijn. Met name de verplaatsing van 2280 meter binnen ruim een etmaal is opmerkelijk en groter dan ooit gerapporteerd uit studies binnen het natuurlijke verspreidingsgebied (zie Kapfer *et al.*, 2008). Of dit te wijten is aan de mogelijk recente uitzetting van desbetreffend dier is onduidelijk. Meer dan eens is melding gedaan dat getransloceerde slangen dikwijls grotere afstanden afleggen dan natuurlijk aanwezige exemplaren (Lee & Park, 2011; Roe *et al.*, 2010) maar of dit van toepassing is op dit dier is speculatief.

Figuren 10–12: (Minimale) verplaatsingen (incl. afstanden) van drie *Pituophis* spec. in de duinen (v.l.n.r.: P03, P06, P10).

3.4 Conclusie

Vanaf 2013 zijn 26 betrouwbare *Pituophis*-waarnemingen in de duinen tussen Scheveningen en Katwijk gedaan; het betreft maximaal 19 verschillende individuen. Het aantal waarnemingen is vanaf 2013 toegenomen, met een sterke piek in 2017. Drie dieren zijn meerdere keren waargenomen, waarbij in één geval spectaculaire afstanden zijn afgelegd. Doordat een aantal dieren is weggevangen of in het verkeer is omgekomen, kunnen er nog negen dieren aanwezig zijn. Dit aantal is echter mogelijk hoger, omdat de

kans reëel is dat niet alle dieren zijn waargenomen en gemeld. De waarnemingen bevinden zich in het gehele duingebied, zowel in de binnenduinen als duinrand, inclusief de bebouwde kom.

4 Taxonomische status

4.1 Methode

Van vier levende dieren die ter beschikking stonden is wangslijmvlies afgenomen middels een mondswab. Van drie dode dieren is spierweefsel afgenomen. Vervolgens is het DNA van de weefselsamples en swabsamples geëxtraheerd met behulp van de Qiagen Dneasy Blood & Tissue kit van Qiagen. Daarna is een Polymerase Chain Reaction (PCR) uitgevoerd waarbij gebruik gemaakt is van Qiagen DNA-polymerase. Hierbij is een deel van het mitochondriale gen NADH subunit 4 (ND4) geamplificeerd (vermeerderd) en gesequenced (uitgelezen). Normaal gesproken is het ND4-gen voldoende om een soort te herkennen. Echter, hybriden kunnen op basis van mitochondriale genen niet met zekerheid geïdentificeerd worden. Mitochondriaal DNA wordt uitsluitend via de vrouwelijke lijn overgeërfd. Als gevolg daarvan kan niet worden vastgesteld of genetisch materiaal van de mannelijk lijn van een andere soort afkomstig is. Om vast te stellen of er sprake is van hybridisatie, is daarom ook het nucleaire gen Vimentin (intron 4 en intron 5) geamplificeerd. Zuivere soorten dragen van deze genen slechts één allel (variant), dat specifiek is voor een bepaalde soort. Bij zuivere soorten verwachten we dus dat Vimentin 4 en 5 homozygoot zijn, omdat ze uitsluitend alleen van één soort dragen. Bovendien zullen het mitochondriaal DNA (ND4) en de Vimentin-genen dan wijzen op dezelfde soort. F_1-hybriden daarentegen dragen twee allelen van dit gen, van iedere oudersoort één. Dergelijke hybriden zullen derhalve heterozygoot zijn voor de Vimentin 4 en 5 genen. Het mitochondriaal DNA (ND4) kan in dat geval uitwijzen tot welke soort het moederdier behoorde. Binnen het geslacht kunnen zowel intergenerische hybriden en intergrades vruchtbaar zijn (B. Skubowius schr. med.; H. Bronsgeest, pers. med.). Wanneer hybridisatie meer dan één generatie terug heeft plaatsgevonden, hetgeen bij veel (ex-) gevangenschapsdieren het geval zal zijn, zal slechts een deel van de genen ook een allel bevatten afkomstig van de in het verleden ingekruiste soort. Zodoende kan slechts één, of zelfs geen van beide Vimentin-genen heterozygoot zijn en kan het mitochondriaal DNA op een andere soort wijzen dan het nucleair DNA. Als het mitochondriaal DNA en nucleair DNA elkaar tegenspreken, wijst dit dus op hybridisatie in het verleden.

Tabel 1: Gebruikte primers voor bepaling van de taxonomische status

Gen	Primer	Primer sequentie	Referentie
NADH subunit 4	ND4-F	TGACTACCAAAAGCTCATGTAGAAGC	Arevalo *et al.*, 1994; Rodríguez-Robles & De Jesús-Escobar, 2000
NADH subunit 4	Leu-R	CATTACTTTTACTTGGATTTGCACCA	Arevalo *et al.*, 1994; Rodríguez-Robles & De Jesús-Escobar, 2000
NADH subunit 4	ND4*	CACCTATGACTACCAAAAGCTCATGTAGAAGC	Sites *et al.*, 1996
Vimentin Intron 5	VimExon5F	AACAATGATGCCCTGCGCCA	Pyron & Burbrink, 2009
Vimentin Intron 5	VimExon6R	CAATATCAAGAGCCATCTTTACATT	Pyron & Burbrink, 2009
Vimentin Intron 4	VimExon4SeqF	AAGCCCAAATCCAGGATC	Pyron & Burbrink, 2009
Vimentin Intron 4	VimIntron5R	AGCATAAGGGAGGACATAAAA	Pyron & Burbrink, 2009

*Deze primer is bij enkele monsters gebruikt als alternatief voor de ND4-F primer, omdat van enkele exemplaren geen zuiver PCR-product gevormd werd met de ND4-F primer.

De geamplificeerde PCR-fragmenten zijn gesequenced met behulp van Sanger Sequencing. De uitgelezen fragmenten zijn vergeleken met de referentiedatabase in Genbank. Door de uitgelezen fragmenten te vergelijken met de referentiedata, kan vastgesteld worden of het een hybride betreft en welke oudersoorten betrokken zijn. De identificatie werd uitgevoerd tot op soortniveau. Ondersoorten kunnen op basis van deze analyse niet onderscheiden worden.
Aanname bij de data-analyse is, dat vastgestelde DNA-sequenties overeenkomen met de DNA- sequenties uit eerder gepubliceerde literatuur welke beschikbaar is op Genbank (zie ook: Pyron & Burbrink, 2009).
De verwerking, genetische analyse en gegevensinterpretatie is uitgevoerd door Datura Molecular Solutions BV.

4.2 Resultaten

Bij alle zeven onderzochte individuen zijn allelen gevonden die behoren tot verschillende soorten (tabel 2). Bovendien waren mitochondriaal DNA en de nucleaire genen vaak afkomstig van verschillende soorten. Dit alles duidt erop dat er in sterke mate sprake is van hybridisatie in de aangetroffen individuen. Het mitochondriaal DNA (ND4) geeft aan dat er in ieder geval DNA van *P. catenifer affinis*, *P. melanoleucus* en *P. catenifer sayi* of *P. ruthveni* aanwezig is. De nucleaire genen geven daarnaast aan dat er hoogstwaarschijnlijk ook DNA van *P. melanoleucus* ingekruist is.

Tabel 2: Resultaten genetische analyse van zeven *Pituophis* spec. (Resultaten waarbij twee soorten zijn genoemd met '()' (bv. *P. ruthveni* (*P. melanoleucus*)) betekent dat er op basis van de referentie-database een match was voor de eerste soort. Gezien het uiterst geringe onderscheid tussen beide soorten (1 SNP) en de reële optie dat de referentie-database (nog) niet compleet is, wordt het onderscheidend vermogen tussen beide nauwverwante soorten vooralsnog als matig betrouwbaar geacht. Resultaten waarbij twee soorten zijn genoemd met '/' (bijv. P. *ruthveni*/*P. melanoleucus* betekenen dat het signaal onduidelijk was en het één van beide (onder)soorten betreft. Resultaten waarbij 'onbekend' is genoemd betekenen dat het DNA van een slang is gevonden, vermoedelijk uit het genus *Pituophis*, maar in theorie ook uit een ander genus.

Dier	ND4 resultaten	VIM5 resultaten; homo-/heterozygoot	VIM4 resultaten; homo-/heterozygoot
P03	*P. catenifer sayi* of *P. ruthveni*	*P. ruthveni* (*P. melanoleucus*); homozygoot	geen uitleesbaar resultaat
P18	*P. catenifer sayi* of *P. ruthveni*	*P. ruthveni* (*P. melanoleucus*) ; homozygoot	geen uitleesbaar resultaat
P10	*P. catenifer sayi* of *P. ruthveni*	*P. melanoleucus* (*P. ruthveni*) X onbekend; heterozygoot	*P. melanoleucus* (P. *ruthveni*) X *P. catenifer/vertebralis*; heterozygoot
P12	*P. catenifer sayi* of *P. ruthveni*	*P. catenifer sayi* X onbekend; heterozygoot	geen uitleesbaar resultaat
P14	*P. catenifer sayi* of *P. ruthveni*	geen uitleesbaar resultaat	*P. melanoleucus* (*P. ruthveni*); homozygoot
P06	*P. melanoleucus*	*P. catenifer sayi* X *P. ruthveni* (*P. melanoleucus*); heterozygoot	*P. melanoleucus* (*P. ruthveni*); homozygoot
P16	*P. catenifer affinis*	*P. ruthveni* (*P. melanoleucus*); homozygoot	*P. melanoleucus* (*P. ruthveni*); homozygoot
P13	*P. catenifer affinis*	*P. ruthveni*/*P. melanoleucus* X onbekend; heterozygoot	*P. melanoleucus* (*P. ruthveni*) X *P. catenifer/vertebralis*; heterozygoot

De identificaties op basis van de Vimentin-genen bleken lastig te zijn. Een groot deel van de individuen bleek heterozygoot te zijn voor Vimentin 4 en/of 5, hetgeen laat zien dat er sprake is van hybridisatie. In een deel van de gevallen kon herleid worden van welke oudersoorten de allelen waarschijnlijk afkomstig zijn. Echter, de genetische verschillen in Vimentin 4 en 5 tussen nauw verwante soorten bleken zeer gering. Dit maakt identificatie

van verwante soorten lastig. Zo verschilde *P. ruthveni* en *P. melanoleucus* met slechts één SNP (één nucleotide in het DNA waarop variatie aanwezig is), in beide Vimentin-genen. Bovendien bestaat er mogelijk genetische variatie binnen het genus *Pituophis* die nog niet eerder beschreven is. Het is dus niet mogelijk om met 100% zekerheid vast te stellen van welke oudersoorten de allelen afkomstig zijn. Wel is zeker te zeggen dat er bij alle onderzoeksdieren sprake is van hybridisatie.

4.3 Discussie

Het bleek onmogelijk om met zekerheid de exacte identiteit van individuen vast te stellen. Dit heeft drie hoofdoorzaken:

- Er is sprake van een sterke mate van hybridisatie die over meerdere generaties heeft plaatsgevonden;
- De genetische diversiteit in de Vimentin-genen is klein;
- Er is DNA aanwezig van minimaal drie soorten, hetgeen de analyses zeer complex maakt.

Om van een individu inzichtelijk te maken voor welk percentage het genoom bestaat uit DNA van iedere mogelijke oudersoort, is complex onderzoek nodig. Hiervoor zou genoom-breed gekeken moet worden naar tientallen, zo niet duizenden SNP's (kleine genetische verschillen tussen soorten).

Wel kan op basis van mitochondriaal DNA met zekerheid vastgesteld worden, dat er DNA van *P. catenifer affinis*, *P. melanoleucus* en *P. catenifer sayi* of *P. ruthveni* aanwezig is in de bemonsterde dieren. De genetische diversiteit binnen het mitochondriale ND4 gen is groot. De vrouwelijke voorouder is dus met zekerheid te identificeren. Alleen *P. catenifer sayi* en *P. ruthveni* bleken op basis van mitochondriaal DNA niet te onderscheiden, omdat deze twee soorten genetisch nauw verwant zijn (Rodríguez-Robles *et al.*, 2000). Op basis van de ND4 analyses kan dus niet worden vastgesteld of we te maken hebben met *P. c. sayi* of met *P. ruthveni*. In gevangenschap is *P. ruthveni* zeldzaam en de soort heeft een hogere marktwaarde ten opzichte van *P. c. sayi*. Deze laatste soort is algemeen binnen de terrariumhobby en vertegenwoordigt een lage(re) marktwaarde. Bij een fenotypische beoordeling door internationale specialisten van dit genus van alle *Pituophis* spec. waarvan beeldmateriaal voorhanden was, werd sterk geneigd naar invloeden van *P. c. sayi* en *P. melanoleucus* (incl. hybriden) (B. Skubowius, schr. med.; H. Bronsgeest, pers. med.). Zelfs dier P06 dat fenotypisch onmiskenbaar op *P. m. melanoleucus* lijkt (zie figuur 17 en kaft), blijkt geen zuiver dier te zijn maar een hybride.

Bugter *et al.* (2014) melden dat geen gevallen van *Pituophis*-hybridisatie in de door hen geraadpleegde literatuur bekend waren. Echter, van verschillende soorten binnen het geslacht *Pituophis* is bekend dat zij kunnen hybridiseren, zowel intergenerisch als intragenerisch. Intragenerische hybridisatie is vermoedelijk mogelijk tussen alle soorten en ondersoorten van het geslacht *Pituophis* en in gevangenschap frequent aangetoond, onder andere tussen *P. c. sayi* en *P. m. melanoleucus*, de zogenaamde "Pin Bulls" (H. Bronsgeest, pers. med.). Ditzelfde geldt voor ondersoorten waarbij dan van intergradatie wordt gesproken. Ook de in H4.2 gepresenteerde resultaten onderbouwen het brede hybridisatievermogen van *Pituophis*-soorten. In het wild zijn intergrades tussen *P. c. sayi* en *P. c. affinis* vastgesteld (Bartlett & Bartlett, 2009). Intergenerische hybridisatie is in

gevangenschap vastgesteld met soorten uit het geslacht *Pantherophis*: *Pituophis c. sayi* x *Pantherophis guttatus*, *P. c. catenifer* x *P. guttatus* ("gopher corns") en *P. melanoleucus* x *Pantherophis alleghaniensis* (Fankhauser & Cumming, 2008; ratsnakefoundation.org). Ook in het wild is intergenerische hybridisatie vastgesteld: *P. c. sayi* x *Scotophis vulpinus* (LeClere *et al.*, 2012).

Zowel intergenerische hybriden en intergrades kunnen reproductief vruchtbaar zijn (B. Skubowius schr. med.; H. Bronsgeest, pers,. med.). Van tenminste één intragenerische hybride (*P. c. sayi* x *P. guttatus*) is eveneens aangetoond dat deze vruchtbaar is (B. Skubowius schr. med.). Het huidige onderzoek maakt dit ook inzichtelijk bij dier P13, dat zich als hybride succesvol heeft voortgeplant (zie H6).

In het betreffende kustgebied komen van nature geen inheemse slangensoorten voor. Er zijn echter in het recentere verleden wel diverse exotische soorten aangetroffen, waaronder kousebandslangen (*Thamnophis* spec.), steppenslang (*Elaphe dione*) en zwarte rattenslang (*Pantherophis obsoletus* sensu lato) (Anonymous, 2007; archief Dunea/RAVON). Tussen 2000 en 2012 zijn in totaal zijn vier exemplaren van *P. obsoletus* sensu lato in de duinstrook aangetroffen. Van *Pantherophis alleghaniensis*, een soort die nauw verwant is aan het (voormalige) *P. obsoletus* complex (Bubrink *et al.*, 2000; Bubrink, 2001) is bekend dat deze met *P. melanoleucus* kan hybridiseren (Fankhauser & Cumming, 2008).

4.4 Conclusie

Bij zeven dieren is DNA van een of meerdere van de volgende (onder)soorten aangetroffen: *P. catenifer affinis*, *P. melanoleucus* en *P. catenifer sayi* of *P. ruthveni*. Er is in het verleden sprake is geweest van hybridisatie, waardoor er geen sprake meer is van genetisch zuivere dieren. Fenotypisch gezien lijken invloeden van *P. c. sayi* en *P. melanoleucus* dominant te zijn, ook bij niet gegenotypeerde dieren. Echter, ook bij ogenschijnlijk zuivere dieren gaat het om hybriden. Geconcludeerd moet worden dat er in hoge mate sprake is van hybridisatie en dat er geen eenduidige (zuivere) soort in de duinen aanwezig is.

5 Dieet

5.1 Methode

In de periode 2015 - 2017 zijn drie *Pituophis* verkeersslachtoffers verzameld en vier levende dieren weggevangen en in ReptielenZOO "SERPO" opgevangen. Middels dissectie van de drie verkeersslachtoffers is de maag- en darminhoud verzameld. Bij drie van de vier levende dieren is hun eerste ontlasting na vangst verzameld. Alle monsters zijn geanalyseerd op de aanwezigheid van DNA van vertebraten, waarbij vrijwel alle exemplaren tot op soort geïdentificeerd kunnen worden. Het analyseren van een DNA-sample heeft plaatsgevonden in drie stappen. Eerst wordt het DNA geconcentreerd en gezuiverd. Vervolgens wordt een controle-analyse uitgevoerd om te testen of de detectie van environmental DNA (eDNA) in een sample eventueel geïnhibeerd wordt door storende stoffen. Tenslotte wordt het eDNA gedetecteerd met behulp van metabarcoding. Een uitgebreide beschrijving van de methode is in bijlage 2 opgenomen. Intacte knaagdier-prooisoorten zijn op basis van de schedel en het gebit op soort gedetermineerd door zoogdierexpert Dick Bekker (Zoogdiervereniging).
De genetische analyse en gegevensinterpretatie is uitgevoerd door Datura Molecular Solutions BV.

Figuren 13 & 14: Dissectie voor het verzamelen van maaginhoud (links) en darminhoud (rechts) van verkeersslachtoffer P03 (Foto's: R. Struijk)

5.2 Resultaten

In vijf van de zes samples is DNA aangetroffen van prooidieren, namelijk rosse woelmuis (*Myodes glareolus*), veldmuis (*Microtus arvalis*), bosmuis (*Apodemus sylvaticus*), huismuis (*Mus musculus*) en konijn (*Oryctolagus cuniculus*) (tabel 3 en bijlage 3). Aanvullend is één intacte prooi op basis van de schedel en het gebit gedetermineerd als bosmuis. Naast knaagdieren is in één mestmonster DNA van de zebravink (*Poephila guttata*) aangetroffen. Vanwege de hoge concentratie aan DNA van deze soort, lijkt het minder aannemelijk dat het een contaminatie van het monster betreft. Aangetroffen sporen van schaap, varken, mens en zilverbladvis (*Monodactylus argenteu*) worden wel als contaminaties beschouwd.

Tabel 3: Prooisoorten van *Pituophis* sp. in de duinen tussen Scheveningen en Katwijk

Dier	Kop-cloaca lengte (cm)	Staartlengte (cm)	Monstertype	Prooi
P03	99,8	14,1	maag- en darminhoud	rosse woelmuis, veldmuis, bosmuis
P10	115,4	16,7	maag- en/of darminhoud	bosmuis
P12	125,2	17,5	mest	huismuis, zebravink
P13	151,2	23,9	mest	-
P16	116,5	15,3	mest	konijn
P18	49,8	8	maaginhoud	bosmuis

5.3 Discussie

Op basis van de analyse tekent zich een duidelijk prooispectrum af, namelijk knaagdieren. Dit komt in algemene zin overeen met het natuurlijke dieet van *Pituophis* spec., waarbij vooral goffers (*Geomyidae*) geliefde prooidieren zijn (Rodriguez-Robles, 1998, 2002; Rudolph *et al.*, 2002; Burger & Zappalorti, 2011). Een uitgebreid prooionderzoek bij *P. catenifer* maakte inzichtelijk, dat het dieet van deze soort hoofdzakelijk uit zoogdieren bestaat maar tevens uit vogels, vogeleieren, hagedissen en in zeer zeldzame gevallen zelfs uit schildpadeieren, amfibieën en insecten (Rodriguez-Robles, 2002). *Pituophis*-soorten staan bekend om hun actieve foerageergedrag en het ondergronds vangen van prooien, hoewel zij ook kunnen klimmen om bijvoorbeeld vogelnesten te bereiken (Craig *et al.*, 2002; Rodrigues-Robles, 2002; COSEWIC, 2017). Van *P. c. sayi* is bekend dat zij frequent nesten van knaagdieren en vogels plunderen en dus ook kleine prooidieren als babymuizen, jonge vogels en eieren buit maken (Rodríguez-Robles, 2002). Met uitzondering van de zebravink, bestaan alle in het huidige onderzoek aangetroffen prooisoorten uit holbewonende zoogdieren. De vondst van een intacte nestjonge woelmuisachtige in de maaginhoud van dier P03, toont aan dat desbetreffend dier een nest heeft geplunderd.

Opvallend is dat, naast de meer gebruikelijke contaminaties zoals schaap en varken, ook zilverbladvis is vastgesteld. Bij navraag bleek dat de dierenarts die de sectie mede heeft verricht, deze vissoort recentelijk op de operatietafel heeft gehad, hetgeen de contaminatie verklaart. Een opmerkelijke prooisoort, die naast de knaagdieren naar voren is gekomen, is de zebravink. Hoewel aanvankelijk aan contaminatie werd gedacht, is de hoeveelheid aangetroffen DNA groot en kon bij navraag bij ReptielenZOO “SERPO”, waar het mestmonster is verzameld, geen enkele connectie worden gemaakt met zebravinken. Uitgesloten kan worden dat de zebravink in de duinen is gevangen en verorberd. De soort is wel een veelvoorkomende kooivogel, wordt veelvuldig gekweekt en heeft een lage marktwaarde. Hoewel niet gebruikelijk binnen de terrariumhobby, komt het voor dat kooivogels, waaronder zebravinken, maar ook grasparkieten (*Melopsittacus undulatus*) en valkparkieten (*Nymphicus hollandicus*), sporadisch worden gevoerd aan terrariumslangen (Anonymous, pers. med.). Nog opmerkelijker is het dat in desbetreffend mestmonster ook sporen van huismuis zijn aangetroffen. Deze slang (P12) is tegen de duinrand van Scheveningen net binnen de bebouwde kom gevonden. Hoewel in de duinrand huismuizen bekend zijn (NDFF), zou ook deze prooisoort kunnen duiden op een gevangenschapsprooi. Laboratoriummuizen, veelvuldig als voederdieren binnen de

terrariumhobby gebruikt, zijn gedomesticeerde huismuizen en hebben zodoende hetzelfde DNA. De combinatie van zebravink en huismuis is daarom extra verdacht. Mogelijk is deze slang kort na uitzetting/ontsnapping gevangen met nog voedseldieren uit het terrarium in het spijsverteringskanaal. Hoewel dit een reële optie lijkt, ontbreekt hard bewijs hiervoor.
De overige prooisoorten zijn inheemse en in dit duingebied en aangrenzende bebouwde gebieden voorkomende soorten.

Hoewel niet aangetroffen in de huidige analyse, is het vanwege de ecologie van *Pituophis* spec. aannemelijk dat zij in de duinen ook andere niet-zoogdierprooien tot zich kunnen nemen. Binnen het duingebied Scheveningen – Katwijk komt de beschermde zandhagedis (*Lacerta agilis*) voor. De soort kent hier, vooral in het zuidelijke en centrale deel, een ruime verspreiding en komt plaatselijk in hoge dichtheden voor. Er kan niet worden uitgesloten dat deze soort tot het dieet van de slangen kan behoren. Uit een breed prooionderzoek bleken vooral kleinere slangen (kop-cloaca lengte gemiddeld 56,9±28 cm; range 25,5–105,1 cm) ook op hagedissen te prederen (Rodrriguez-Robles, 2002). Van de zes dieren uit dit prooionderzoek is er slechts één exemplaar (P18) kleiner dan dit gemiddelde. De kans dat de zandhagedis in de huidige steekproef zou zijn aangetroffen is derhalve beperkt. Naast de zandhagedis kunnen vogelsoorten die in de duinen voorkomen eveneens als prooi dienen. Ditzelfde geldt voor hun eieren. Van *P. catenifer* is bekend dat zij vrij opportunistische eters zijn en er een breed voedselspectrum op na kunnen houden (Rodríguez-Robles, 2002; McAllister *et al.*, 2016). Desondanks zijn er substantiële verschillen in dieet tussen verschillende locaties aangetoond (Rodríguez-Robles, 1998). Het vermogen om diverse voedselbronnen te kunnen gebruiken, maakt de soort weerbaarder en is gunstig voor de overlevingkansen van individuen.

5.4 Conclusie

Prooien bij zes uit de kustduinen afkomstige *Pituophis*-individuen blijken uitsluitend uit knaagdieren te bestaan. Het voorkomen van de zebravink als prooidier kan enkel toe te schrijven zijn aan een gevangenschapsprooi. Op basis van literatuurgegevens is bekend dat onder andere *Pituophis catenifer* ook op vogels, hun eieren en hagedissen predeert. Lokaal voorkomende soorten zoals de beschermde zandhagedis kunnen mogelijk ook tot het voedselspectrum van *Pituophis* spec. behoren.

6 Voortplanting

6.1 Methode

Er heeft geen gericht onderzoek naar de voortplanting van *Pituophis* spec. plaatsgevonden. Echter, tweemaal heeft een in de duinen gevangen vrouwtje *Pituophis* spec. korte tijd later in ReptielenZOO "SERPO" een eilegsel geproduceerd. Van deze twee eigelsels zijn de datum van het afzetten van eieren, legselgrootte, incubatiemethode en incubatieduur geregistreerd. Hiervoor is medewerking verleend door ReptielenZOO "SERPO".

6.2 Resultaten

Op 27-6-2016 werd dier P06 uit de duinen weggevangen en zij zette in juli 19 eieren af. Aanvankelijk leken 15 eieren (79%) op basis van visuele inspectie bevrucht te zijn (W. Getreuer, pers. med.). Getracht is de eieren bij een temperatuur van 28,5-29°C 'au bain-marie' te incuberen, maar alle eieren zijn vroegtijdig beschimmeld en niet uitgekomen. De eieren zijn niet geopend om te bepalen of er aanwijzingen voor werkelijke bevruchting waren.

Dier P16 werd op 28-6-2017 in de duinen gevangen en zette op 2-7-2017 zeven eieren af. De eieren hadden op 7-7-2017 een gemiddelde lengte van 70,4±6,33 mm, een breedte van 31,1±3,61 mm en een gewicht van 41,48 gr (N=6). Zij zijn bij 27,7±0,3°C 'au bain-marie' geïncubeerd. Vier eieren bleken bevrucht, waarvan er drie na 67 dagen op 7-9-2017 zijn aangesneden (er zijn dan sneetjes in de eischaal zichtbaar, die de jongen met hun eitand maken). Op 9-9-2017 hebben zij het ei verlaten. Het vierde bevruchte ei is niet uitgekomen en bevatte een volgroeid afgestorven embryo.

Figuren 15 & 16: Eilegsel van dier P16 met een zichtbare kiemschijf, het bewijs voor bevruchting (boven) en uitkomende eieren van het desbetreffend legsel (Foto's: N. Aarts & R. Struijk)

6.3 Discussie

De vondst van twee drachtige vrouwtjes *Pituophis* spec. in de duinen is zeer interessant. Met name het drachtige dier P06 uit 2016 is interessant, omdat het dier de winter ook in de duinen heeft doorgebracht en het dier dus reeds langere tijd in het wild verbleef. Hoewel een deel van haar legsel ogenschijnlijk bevrucht leek, is hier door ReptielenZOO "SERPO" geen strikte controle op uitgevoerd. Vanwege het feit dat verschillende slangen sperma voor langere duur kunnen opslaan (Booth & Schuett, 2009; Siegel *et al.*,2011), kan niet worden uitgesloten dat dit dier reeds bevrucht is uitgezet.

Tot dusver zijn er geen bewijzen voor succesvolle voortplanting in de Zuid-Hollandse duinen. Er zijn nooit juveniele dieren aangetroffen; slechts tweemaal is een subadult dier gevonden. Alle overige waarnemingen betroffen adulte (geslachtsrijpe) exemplaren. Twee weggevangen vrouwtjes bleken bij vangst drachtig te zijn en beide dieren hebben bij ReptielenZOO "SERPO" eieren afgezet. Ondanks dat in de media is gesuggereerd dat de soort zich voortplant in de duinen, is hier geen bewijs voor. De drachtige dieren kunnen ook drachtig/bevrucht zijn losgelaten en bovendien is onduidelijk of de klimatologische omstandigheden ter plaatse voldoende geschikt zijn voor een succesvolle incubatie. Aangezien van *Pituophis*-soorten bekend is dat zij in de regel hun eieren in zelf gegraven holen leggen (Burger & Zappalorti, 1986, 1991, 1992; Beane & Pusser, 2012) en deze afhankelijk zijn van zonnewarmte, is een langere periode met voldoende hoge zomertemperaturen noodzakelijk. Hoewel Bugter *et al.* (2014) vermelden dat ook broeihopen worden gebruikt voor ei-afzet, wordt geen specifieke referentie gegeven en is dit niet teruggevonden in de wetenschappelijke literatuur die binnen het huidige onderzoek is geraadpleegd. Hoe dan ook zijn dergelijke organische hopen niet (of nauwelijks) aanwezig in de duinen en zijn *Pituophis*-eieren gevoelig voor schimmels wat het twijfelachtig maakt dat ze zich in de vochtige, 'bedompte' atmosfeer van een broeihoop volledig kunnen ontwikkelen.

Eieren van *P. melanoleucus* die onder relatief lage temperaturen worden geïncubeerd, doen er langer over om uit te komen en de juvenielen vertonen een lagere bewegingssnelheid en hebben meer moeite om succesvol te foerageren en geschikte hibernacula te vinden in vergelijking met juvenielen afkomstig uit warmer geïncubeerde eieren (Burger, 1991). Ook vertonen juvenielen uit relatief koel geïncubeerde eieren vaak gedragsstoornissen wat hun overlevingskansen beperkt (Burger, 1989, 1991). Van *P. c. sayi* is beschreven dat juvenielen zonder voedselopname in winterrust kunnen gaan en de eerste periode na uitkomst uit het ei op hun dooierreserves teren (Nussbaum *et al.*, 1983).

6.4 Conclusie

Twee drachtige *Pituophis* spec. zijn in de duinen aangetroffen. Een daarvan verbleef minimaal bijna een jaar in de duinen en heeft daar overwinterd. Van één van de twee eilegsels van deze dieren is bekend dat een deel van de eieren bevrucht was. Onbekend is of dit dier in het wild is bevrucht, of dat het een uitgezet bevrucht of drachtig dier is. Tot dusver zijn geen juveniele *Pituophis* spec. in de duinen aangetroffen en zijn er derhalve (nog) geen harde aanwijzingen voor succesvolle voortplanting. Evenmin is duidelijk of succesvolle voortplanting mogelijk is in het duingebied tussen Scheveningen en Katwijk.

7 'Snake fungal disease' (*Ophidiomyces ophiodiicola*)

De 'snake fungal disease' (SFD; *Ophidiomyces ophiodiicola*) is een keratinische schimmel. Infecties richten zich vooral op de huid en induceren daar lokale ontstekingen. Ze dringen dikwijls dieper in het weefsel door en kunnen ogen, spieren, botten en organen beschadigen (Lorich *et al.*, 2016). Dit kan fatale gevolgen hebben voor geïnfecteerde dieren. Tot voor kort was de schimmel uitsluitend bekend uit de oostelijke Verenigde Staten en binnen de terrariumhobby (Sigler *et al.*, 2013). Bij diverse slangensoorten uit de Verenigde Staten is de schimmel aangetroffen en de eerste populatieafnames zijn gerapporteerd (Sleeman, 2013; Allender *et al.*, 2015). De aandoening is in 2017 voor het eerst bij twee in Europa voorkomende slangensoorten gemeld, namelijk ringslang (*Natrix helvetica*) en dobbelsteenslang (*Natrix tesselata*) (Franklinos *et al.*, 2017).

7.1 Methode

Van twee dode en vijf levende *Pituophis* spec. zijn huidswabs afgenomen. Van één dier is een verse vervellingshuid gebruikt.
De analyse en gegevensinterpretatie is uitgevoerd door de Universiteit van Gent.

7.2 Resultaten

Er zijn geen sporen van *Ophidiomyces ophiodiicola* aangetroffen.

7.3 Discussie

Geen van de onderzochte dieren bleek geïnfecteerd te zijn met de snake fungal disease. Er zijn ook geen verdachte dieren aangetroffen. Het enige dier dat wel met verwondingen is aangetroffen (P06) is hoogstwaarschijnlijk door een vos verwond. Een indicatie hiervoor waren de regelmatige onderlinge afstanden tussen de wondjes. Het dier in kwestie is (in gevangenschap) hersteld en de wonden zijn goed genezen. Dit dier maakte ook onderdeel uit van de groep die onderzocht is.

7.4 Conclusie

Er zijn geen indicaties voor de aanwezigheid van *Ophidiomyces ophiodiicola* bij *Pituophis* spec. in de duinen.

8 Conclusie en aanbevelingen

Er leeft een opvallend groot en ogenschijnlijk groeiend aantal slangen van het geslacht *Pituophis* in de kustduinen tussen Scheveningen en Katwijk. Vanwege het grote aantal dieren, lijkt het om een bewuste uitzetting te gaan en niet om incidentele ontsnappingen. Mogelijk gaat het zelfs om herhaaldelijke uitzettingen.
De taxonomische status van de dieren is divers en het overgrote deel lijkt van hybride aard, waarbij *P. melanoleucus*, *P. c. affinis* en *P. c. sayi* of *P. ruthveni* vertegenwoordigd zijn. Ook ogenschijnlijk zuivere dieren blijken hybriden te zijn en van de aanwezigheid van een eenduidige soort is derhalve geen sprake. Het is bekend dat *Pituophis* spec. zowel intergenerisch als intragenerisch kunnen hybridiseren (en intergrederen) en dat dit tot vruchtbare nakomelingen kan leiden.
Circa 53% (N=19) van de aangetroffen (unieke) dieren is niet meer in de duinen aanwezig; zij zijn ofwel verwijderd en in gevangenschap opgevangen of zijn verkeersslachtoffer geworden.
Het dieet van een zevental uit de duinen afkomstige dieren bestond uit knaagdieren. Een aangetroffen zebravink als prooidier is vrijwel zeker te herleiden tot een gevangenschapsprooi; deze slang moet kort voordat zij is weggevangen zijn uitgezet/ontsnapt. Het aangetoonde dieet komt overeen met dat in het natuurlijke verspreidingsgebied (hoofdzakelijk knaagdieren), al wordt het dieet daar ook uitgebreid met onder andere vogels, eieren en hagedissen. Het is aannemelijk dat dergelijke prooien, waaronder de (beschermde) zandhagedis, ook in de duinen tussen Scheveningen en Katwijk gepredeerd kunnen worden.
Twee vrouwelijke dieren die zijn weggevangen, hebben kort daarna in gevangenschap eieren gelegd. Tenminste één legsel bevatte bevruchte eieren, die ook zijn uitgekomen. Deze waarnemingen vormen echter geen bewijs voor succesvolle voortplanting, zelfs niet voor succesvolle bevruchting in de duinen. Onbekend is of de klimatologische omstandigheden voldoende zijn voor de volledige ontwikkeling van in de duinen afgezette eieren. Tot dusver zijn geen juveniele *Pituohpis* spec. aangetroffen.

Vanwege de genetisch onzuivere aard van de aanwezige dieren zijn ecologische aspecten lastiger in te schatten. Ieder genetisch vertegenwoordigde (onder)soort kan een eigen en afwijkende ecologie hebben in vergelijking met andere. Dit kan van invloed zijn op aspecten zoals overleving, vestiging en uitbreiding (inclusief voortplanting) maar ook op de mogelijk ecologische schade. Ondanks de grote mate van hybridisatie, lijkt een belangrijke genetische vertegenwoordiging van de soorten *P. catenifer* en *P. melanoleucus* op basis van de genetische analyse, algemeenheid in gevangenschap en de relatief geringe marktwaarde het meest aannemelijk. Indien een risicobeoordeling opgesteld dient te worden, zou die op deze twee soorten gericht kunnen worden. Het opstellen van een beknopte risicoanalyse voor *P. melanoleucus* en een update van de bestaande risicoanalyse voor *P. catenifer* (Bugter *et al.*, 2014) zijn mogelijk zinvol voor de NVWA.

Verder verdient het ten zeerste de aanbeveling om tenminste de komende 3-5 jaar een vinger aan de pols te houden voor wat betreft nieuwe waarnemingen in het duingebied tussen Scheveningen en Katwijk. De dataverzameling, het verzamelen van dode dieren en de dataverwerking kunnen overeenkomen met het huidige onderzoek. Deze manier van

werken heeft in het huidige vroege stadium van signalering al veel nuttige informatie opgeleverd.

Figuur 17: Dier P06 in de binnenduinen (Foto: R. Struijk)

Om specifiek meer inzicht te krijgen in de mogelijkheden tot voortplanting, kan een onderzoek worden opgezet omtrent omgevingsvariabelen zoals bodemtemperatuur. Dit kan informatie opleveren op basis waarvan een betere inschatting kan worden gemaakt over het al dan niet kunnen uitkomen van bevruchte eieren. RAVON heeft contacten met *Pituophis*-onderzoekers uit de meest noordelijke contreien van het verspreidingsgebied in de Verenigde Staten en Canada. Vergelijking met daar heersende klimatologische omstandigheden verschaft inzicht in het natuurlijke incubatieregime. Omdat uit de duinen verwijderde dieren van beide geslachten voorhanden zijn, kan tevens een experiment worden gestart waarbij in gevangenschap verkregen bevruchte eieren in de duinen worden geïncubeerd. Dit dient onder strikt toezicht plaats te vinden, waarbij ontsnapping van eventuele juvenielen uitgesloten is. Een dergelijk experiment in combinatie met een bepaling van bodemklimatologische condities kan de onzekerheid over mogelijk succesvolle voortplanting wegnemen.
Om meer over de ecologie in algemene zin te weten te komen, zou een telemetrisch onderzoek gestart kunnen worden. Dit heeft bij de Russische rattenslang veel bruikbare gegevens opgeleverd over onder meer ligging en type hibernacula, voortplantingslocaties, verplaatsingen en de seizoensritmiek (Struijk & van Leeningen, 2017).

9 Dankwoord

Allereerst gaat dank uit naar Bernd Skubowius en Herman Bronsgeest voor het prettige contact en hun behulpzaamheid bij het verstrekken van informatie. Verder worden de volgende personen bedankt voor het doorgeven van waarnemingen, het aanleveren van fotomateriaal of het faciliteren daarvan: D. Krombout, E. Möhlman, W. Boonstra, H. Lucas (allen Dunea), G. Akerboom (politie Katwijk), P. Schilpenoord, F. Steenhuis, J. Koos, E. Witte, N. van Gilst, W. Nijlunsing, M. Landman, T. van der Plas, J. Denkers, J. van Dijk, M. Slaghekke, R. van Dam, C. Kolebrander, B. van Rijn, G. Molenaar. Dick Bekker (Zoogdiervereniging) wordt bedankt voor het determineren van intacte prooidieren. Tot slot wordt het Team Invasieve Exoten (TIE) bedankt, in het bijzonder dhr. Sander Smolders, voor het mogelijk maken van dit onderzoek.

10 Literatuur

Allender, M.C. D.B. Raudabaugh, F.H. Gleason, H. Frank & A.N. Miller, 2015. The natural history, ecology, and epidemiology of *Ophidiomyces ophiodiicola* and its potential impact on free-ranging snake populations. Fungal Ecology 17: 187–196.

Anonymous, 2007. Doodgereden steppenslang in Meijendel. Stichting RAVON. Nieuwsbrief Meetnet Reptielen 39: 17.

Arevalo, E. S.K. Davis & J.W. Sites Jr., 1994. Mitochondrial DNA sequence divergence and phylogenetic relationships among eight chromosome races of the *Sceloporus grammicus* complex (Phrynosomatidae) in central Mexico. Systematic Biology 43(3): 387-418.

Bartlett, R.D. & P.P. Bartlett, 2009. Guide and Reference to the snakes of Western North America (North of Mexico) and Hawaii. University Press Florida: 277 pp.

Bergadá, J., 1998. Zur Nachzucht von Bullennattern der Gattung *Pituophis*. Reptilia 10: 43-47.

Booth, W. & G.W. Schuett, 2011. Molecular genetic evidence for alternative reproductive strategies in North American pitvipers (Serpentes, Viperidae): long-term sperm storage and facultative parthenogenesis, Biological Journal of the Linnean Society. DOI: 10.1111/j.1095-8312.2011.01782.x

Bronsgeest, H., 1998. Verzorging en kweek van *Pituophis melanoleucus lodingi*, de Black Pine Snake. Lacerta 56(4): 126-132.

Burbrink, F.T., 2001. Systematics of the eastern ratsnake complex (*Elaphe obsoleta*). Herpetological Monographs 15: 1-53.

Burbrink, F.T., R. Lawson & J.B. Slowinski, 2000. Mitochondrial DNA phylogeography of the North American rat snake (*Elaphe obsoleta*): a critique of the subspecies concept. Evolution 54: 2107-2114.

Bugter, R.J.F., S. van de Koppel, R.C.M. Creemers, A.J. Griffoen & F.G.W.A. Ottburg, 2014. Uitheemse slangen in Nederland. Een analyse van de kans op introductie, vestiging, uitbreiding en schade. Alterra Wageningen UR, RAVON & Ecologisch adviesbureau Natuurbalans-Limes Divergens: 122 pp.

Burger, J., 1989. Incubation temperature has long-term effects on behavior of young Pine Snakes (*Pituophis melanoleucus*). Behav. Ecol. Sociobiol.24: 201-208.

Burger, J., 1991. Effects of incubation temperature on behavior of hatchling pine snakes: implications for reptilian distribution. Behav. Ecol. Sociobiol. 28: 297-303.

Burger, J. & R.T. Zappalorti, 1986. Nest site selection by pine snakes, *Pituophis melanoleucus*, in the New Jersey Pine Barrens. Copeia 1986(1): 116-121.

Burger, J., R.T. Zappalorti & M. Gochfeld, 1987. Developmental effects of incubation temperature on hatchling pine snakes *Pituophis melanoleucus*. Comp. Biochem. Physiol. A. 87: 727-732.

Burger, J. & R.T. Zappalorti, 1988. Effects of incubation temperature on seks ratios in pine snakes: Differential vulnerability of males and females. Am. Nat. 132: 492-505.

Burger, J. & R.T. Zappalorti, 1991. Nesting behaviour of pine snakes (*Pituophis m. melanoleucus*) in the New Jersey Pine Barrens. J. Herpetol. 25(2): 152-160.

Burger, J. & R.T. Zappalorti, 1992. Philopatry and nesting phenology of pine snakes (*Pituophis melanoleucus*) in the New Jersey Pine Barrens. Behav. Ecol. Sociobiol. 30: 331-336.

Burger, J. & R.T. Zappalorti, 2011. The Northern Pine Snake (*Pituophis melanoleucus*). Its life history, behavior and conservation. Nova Science Publishers Inc., New York: 92 pp.

COSEWIC, 2017. COSEWIC assessment and status report on the Bullsnake *Pituophis catenifer sayi* in Canada. Committee on the Status of Endangered Wildlife in Canada. Ottawa: 34 pp. (www.registrelep-sararegistry.gc.ca/default.asp?lang=en&n=24F7211B-1).

Fankhauser, G. & K.B. Cumming, 2008. Snake Hybridization: A Case for Intrabaraminic Diversity. In: Snelling, A.A. (Ed.) (2008). Proceedings of the Sixth International Conference on Creationism: 117-132.

Franklinos, L., J. Lorch, E. Bohuski, R.F.J. Rodriguez-, O. Wright, L. Fitzpatrick, S.O. Petrovan, C. Durrant, C. Linton, V. Baláž, A.A. Cunningham & B. Lawson, 2017. Emerging fungal pathogen *Ophidiomyces ophiodiicola* in wild European snakes. Scientific Reports 7: 3844: doi.org/10.1038/s41598-017-03352-1.

Gardiner, L.E, 2012. Comparative ecology of three sympatric snake species in Southwestern Saskatchewan. Thesis University of Regina: 79 pp.

Gerald, G.W., M.A. Bailey & J.N. Holmes, 2006. Habitat utilization of *Pituophis melanoleucus melanoleucus* (Northern pinesnakes) on Arnold Air Force Base in Middle Tennessee. Southeastern Naturalist 5(2): 253-264.

Hirschkorn, D., 1986. Erfahrungen bei der Pflege und Zucht der selten gehaltenen Bullennatter *Pituophis melanoleucus catenifer*. Herpetofauna 8 (43): 13-16.

Hirschkorn, D. & B. Skubowius, 2011. Bullennattern, Gophernattern, Kiefernattern. Die Gattung Pituophis. Natur und Tier Verlag, Münster: 175 pp.

Iverson, John B., 2014. *Pituophis catenifer sayi* (bullsnake) arboreality. Herpetological Review 45(2): 342.

Iverson, J.B., C.A. Young, T.S.B. Akre, & C.M Griffiths, 2012. Reproduction by female bullsnakes (Pituophis catenifer sayi) in the Nebraska Sandhills. Southwestern naturalist 57(1): 58-73.

Kapfer, J.M., J.R. Coggins & R. Hay, 2008. Spatial Ecology and Habitat Selection of Bullsnakes (*Pituophis catenifer sayi*) at the Northern Periphery of Their Geographic Range. Copeia 2008(4):815-826. https://doi.org/10.1643/CE-07-104

Kasper, S., 2014. *Pituophis catenifer sayi* (bullsnake) diet. Herpetological Review 45(2): 341-342.

LeClere, J.B., E.P. Hoaglund, J. Scharosch, C.E. Smith & T. Gamble, 2012. Two Naturally Occurring Intergeneric Hybrid Snakes (*Pituophis catenifer sayi* × *Pantherophis vulpinus*; Lampropeltini, Squamata) from the Midwestern United States. Journal of Herpetology 46(2): 257-262.

Lorch, J.M. J. Lankton, K. Werner, E.A. Falendysz, K. McCurley & D.S. Blehert, 2015. Experimental Infection of Snakes with *Ophidiomyces ophiodiicola* Causes Pathological Changes That Typify Snake Fungal Disease. mBio. 6(6): e01534–15–e01534–15. doi:10.1128/mBio.01534-15.

McAllister, J.M., J.R. Maida, O. Dyer & K.W. Larsen, 2016. Diet of roadkilled Western rattlesnakes (*Crotalus oreganus*) and gophersnakes (*Pituophis catenifer*) ion Southern Britisch Columbia. Northwestern Naturalist 97: 181-189.

Miller, G.J., 2008. Home range size, habitat associations and refuge use of the Florida pine snake, *Pituophis melanoleucus mugitus*, in Southwest Georgia, U.S.A. Thesis University of Florida. 72 pp.

Nussbaum, R.A., E.D. Brodie Jr. & R.M. Storm, 1983. Amphibians and Reptiles of the Pacific Northwest. University of Idaho Press, Moscow, Idaho: 332 pp.

Parker, W.S. & W.S. Brown, 1973. Species composition and population changes in two complexes of snake hibernacula in northern Utah. Herpetologica 29(4): 319-326.

Pyron, R.A. & F.T. Burbrink, 2009. Neogene diversification and taxonomic stability in the snake tribe Lampropeltini (Serpentes: Colubridae). Molecular Phylogenetics and Evolution 52(2): 524-529.

Rodríguez-Robles, J. 2003. Home ranges of gopher snakes (*Pituophis catenifer*, Colubridae) in Central California. Shorter Contributions. Copeia 2: 391-396

Rodríguez-Robles, J.A., & J.M. De Jesús-Escobar, 2000. Molecular systematics of New World gopher, bull, and pinesnakes (Pituophis: Colubridae), a transcontinental species complex. Molecular Phylogenetics and Evolution 14(1): 35-50.

Roe, J.H., M.R. Frank, S.E. Gibson, O. Attum & B.A. Kingsbury, 2010. No place like home: an experimental comparison of reintroduction strategies using snakes. Journal of Applied Ecology 47: 1253–1261.

Rudolph, D.C., S.J. Burgdorf, R.N. Conner, C.S. Collins, D. Saenz, R.R. Schaefer & T. Trees, 2002. Prey handling and diet of Louisiana Pine Snakes (*Pituophis ruthveni*) and Black Pine Snakes (*P. melanoleuells lodingi*), with comparisons to other selected Colubrid snakes. Herpetological Natural History 9: 57-62.

Sigler, L., S. Hambleton & J.A. Paré, 2013. Molecular characterization of reptile pathogens currently known as memers of the chrysosporium anamorph of *Nannizziopsis vriesii* complex and relationship with some human-assiciated isolates. Journal of clinical microbiology 51(10): 3338-3357.

Siegel, D.S., A. Miralles, R.E. Chabarria & R.D. Aldridge, 2011. Female Reproductive anatomy: cloaca, oviduct, and sperm storage. In: Aldridge & Sever (Eds). Reproductive biology and phylogeny in snakes. Science Publishers: 347-410.

Sites Jr., J.W., S.K. Davis, T. Guerra, J.B. Iverson & H.L. Snell, 1996. Character congruence and phylogenetic signal in molecular and morphological data sets: a case study in the living iguanas (Squamata, Iguanidae). Molecular Biology and Evolution 13(8): 1087-1105.

Skubowius, B., 2007. Bull snakes (*Pituophis catenifer sayi*), the keeping of this variable snake species. Literature Serpentium 27(1): 35-47.

Sleeman, J., 2013. Snake Fungal Disease in the United States. National Wildlife Health Center Wildlife Health Bulletin 2013-02.
www.nwhc.usgs.gov/disease_information/other_diseases/snake_fungal_disease.jsp

Struijk, R.P.J.H. & R.A. van Leeningen, 2016. Verspreiding en habitatgebruik van de Russische rattenslang (*Elaphe schrenckii*) in Eelde e.o.. Stichting RAVON, Nijmegen: 28 pp.

Bijlage 1. Waarnemingen van *Pituophis* spec. in de duinen tussen Scheveningen en Katwijk

Dier	Datum	Geslacht	Stadium	Kop-cloaca lengte (cm)	Staartlengte (cm)	Gewicht (gr)	Beeldmateriaal /dier beschikbaar	Mogelijk nog aanwezig	Opmerking
P01	26-8-2013	-	subadult	-	-	-	ja	Ja	-
P02	24-7-2014	-	adult	-	-	-	ja	nee	SERPO †
P03	26-7-2014	-	adult				ja		-
	4-8-2015	♀	adult	99,8	14,1	411	ja	nee	DOR
P04	22-5-2015	-	sub	-	-	-	ja	Ja	-
P05	27-6-2015	-	adult	-	-	-	ja	Ja	-
P06	24-7-2015	-	adult				ja		-
	9-9-2015	-	adult				ja		-
	23-4-2016	-	adult				ja		-
	27-6-2016	♀	adult	151,4	19,2	1366	ja	nee	SERPO
P07	24-6-2016	♂	adult	-	-	-	ja	nee	DOR
P08	21-7-2016	-	adult	-	-	-	nee	Ja	-
P09	4-8-2016	-	adult	-	-	-	ja	Ja	-
P10	14-5-2017	-	adult				ja		-
	22-5-2017	-	adult				ja		-
	23-5-2017	-	adult				ja		-
	25-5-2017	♂	adult	115,4	16,7	602	ja	nee	DOR
P11	14-5-2017	♀	adult	-	-	-	ja	Ja	-
P12	17-5-2017	♂	adult	125,2	17,5	652	ja	nee	SERPO
P13	27-5-2017	♂	adult	151,2	23,9	1392	ja	nee	SERPO
P14	27-5-2017	♂	adult	126,2	16,8	1010	ja	nee	SERPO
P15	17-5-2017	-	adult	-	-	-	ja	Ja	-
P16	18-6-2017	♀	adult	116,5	15,3	458	ja	nee	SERPO
P17	27-5-2017	-	adult	-	-	-	ja	Ja	-
P18	3-9-2017	♂	subadult	49,8	8	78	ja	nee	DOR
P19	18-10-2017	-	adult	-	-	-	ja	ja	-

DOR = Dead On Road

Bijlage 2. Laboratoriumanalyse – prooidieren metabarcoding

De mest, maag- en darminhoud worden geanalyseerd op de aanwezigheid van DNA van vertebraten. Vrijwel alle exemplaren kunnen tot op soort geïdentificeerd worden. Het analyseren van een DNA sample vindt plaats in drie stappen. Eerst wordt het DNA geconcentreerd en gezuiverd. Vervolgens wordt een controle-analyse uitgevoerd om te testen of eDNA detectie in een sample eventueel geïnhibeerd wordt door storende stoffen. Tenslotte wordt het eDNA gedetecteerd met behulp van metabarcoding.

De mest en maag-/darminhouden zijn geanalyseerd op de aanwezigheid van DNA van gewervelden door middel van metabarcoding. Het metabarcoding proces bestaat uit een aantal stappen. Eerst is het DNA uit een monster geconcentreerd en gezuiverd. Vervolgens is DNA geamplificeerd (vermeerderd) met behulp van PCR. De PCR fragmenten zijn gezuiverd en een DNA library is voorbereid. De DNA library is gesequenced met behulp van Next Generation Sequencing (HiSeq).

Het DNA uit de maaginhouden is geëxtraheerd door middel van een Qiagen Blood & Tissue extractie. Het DNA uit de keutels is geëxtraheerd door middel van de QIAamp DNA Stool Mini Kit van Qiagen. Storende stoffen als humuszuren kunnen detectie van het DNA inhiberen, wat kan leiden tot vals negatief resultaat. Gedurende de extractie zijn deze inhiberende stoffen zo veel mogelijk verwijderd.

Vervolgens is het DNA van gewervelden geamplificeerd middels PCR. Hiervoor is een set primers gebruikt welke een kort fragment (~100 bp) van het mitochondriaal DNA vermeerderen. De primers bevatte een unieke tag (7 nucleotiden). Gedurende de bioinformatica analyse kunnen de reads aan de hand van deze tags toegewezen worden aan het juiste sample. De PCR is uitgevoerd met behulp van de TaqMan® Environmental Mastermix 2.0 (Life Technologies®). De PCR is uitgevoerd met vier replica's.

Door middel van gelelektroforese is vastgesteld of de PCR geresulteerd heeft in PCR producten van de juiste lengte. Via een tweede PCR zijn Illumina Nextera XT adaptors aan de PCR producten gezet. Vervolgens zijn de PCR producten samengevoegd. De pool van PCR producten van verschillende samples is gezuiverd. Met behulp van een qPCR en een bio-analyzer run is de concentratie van de pool van PCR producten vastgesteld. De concentratie van de PCR producten is verdund om optimale clustering op de flow cell van de sequencer te bewerkstelligen. Vervolgens zijn de PCR producten gesequenced met behulp van Next Generation Sequencing (HiSeq 4000 platform, 150 bp paired-end). Hierbij worden miljoenen stukjes (zogenaamde reads) van het DNA uitgelezen. In deze stap wordt het fysieke DNA in het buisje dus vertaald in digitale reads. Vervolgens vindt de daadwerkelijke sequencing plaats op een Illumina Sequencer waarna de output van de sequencer vergeleken is met de referentiedatabase om zodoende vast te stellen van welke soorten er eDNA in het sample aanwezig was. Deze referentiedatabase is opgebouwd uit door Datura verzamelde referentie aangevuld met referentiemateriaal welke beschikbaar is in publieke databases (NCBI Genbank).

Bijlage 3. Resultaten prooianalyse metabarcoding

Soort	P03	P10	P12	P13	P16	P18
Prooi						
bosmuis	0	0,045	0	0	0	1
huismuis	0	0	0,044	0	0	0
rosse woelmuis	0,648	0	0	0	0	0
veldmuis	0,352	0	0	0	0	0
konijn	0	0	0	0	0,994	0
zebravink	0	0	0,956	0	0	0
Contaminaties						
schaap	0	0	0	0	0,006	0
varken	0	0	0	0,993	0	0
zilverbladvis	0	0,286	0	0	0	0

Percentages van het totaal aantal DNA fragmenten dat gesequenced is, afkomstig is van een bepaalde (prooi)soort. Sequenties waarvan het percentage reads lager is dan 0,00033 én humane reads zijn verwijderd, omdat dit hoogst waarschijnlijk contaminanten betreft.

RAVON
Reptielen Amfibieën Vissen Onderzoek Nederland

Natuurplaza
Toernooiveld 1 - 6525 ED Nijmegen
Postbus 1413 - 6501 BK Nijmegen

T: 024 - 7 410 600 (alg.)
www.ravon.nl