

Fig. 1. De Groote Heide bij Venlo. Foto Stef Keulen.

Slakjes van de Groote Heide bij Venlo

Sylvia van Leeuwen, Gerard Majoor & Menno Schilthuizen

Snails from Groote Heide near Venlo

Summary. On 9 June, 2025 on Groote Heide near Venlo (province of Limburg), snails were found that could not unequivocally be identified as *Helicella itala* or *Cernuella neglecta*. One specimen fixed in 95% ethanol was submitted to Taxon Foundation for DNA-sequencing. Comparison of that DNA barcode with sequences in the public 'library' of DNA sequences in GenBank yielded the best match (almost 100%) with *Helicella itala*, but matches with some sequences of *Cernuella neglecta* caused doubt. Others have demonstrated in 2011 that errors may exist in GenBank with respect to species of the Helicidae sensu lato, which challenges the initial match with *Helicella itala*. In the end, the snail from Groote Heide is most likely *Cernuella neglecta* rather than *Helicella itala*, and the complete mitochondrial DNA sequence in GenBank (KT696546.1) has been incorrectly assigned to *H. itala*.

Roerig verleden

De Groote Heide bij Venlo is thans een natuurgebied (fig. 1), maar het heeft een roerig verleden. In de Tweede Wereldoorlog was er een vliegveld van de Luftwaffe ('Fliegerhorst Venlo') en in de zestiger jaren was het deels een oefenterrein van de Nederlandse landmacht. In de Tweede Wereldoorlog is er ter misleiding van de geallieerden grond uit het Maasdal gehaald om voor het maskeren van het vliegveld een kleinschalig boeren- en boslandschap aan te leggen. Met kalk werden er ook neppaden aangelegd die zelfs over de start- en landingsbanen liepen (Eenhuistra, 2017; Van Beek, 2025). Legervoertuigen die er in de zestiger jaren manoeuvres uitvoerden waren mogelijk soms eerder ingezet op oefenterreinen in Frankrijk (La Courtine?). Deze voorgeschiedenis kan verklaren waarom er op de Groote Heide soms bijzondere planten gevonden werden (en worden) die atypisch zijn voor de biotoop: overwegend een grasvlakte op zandige bodem (Hermans & Tomas, 1997; Coolen, 1998; Hannen & Maassen, 2012; Van Beek, 2025).

In 2008 vond John Hannen op de Groote Heide huisjes van 'gras- of duinslakjes' die op het oog niet te determineren waren. Bij een gerichte zoektocht van de Mollusken Studiegroep Limburg (MSL) werden in 2011 ook enkele levende exemplaren gevonden. Anatomisch onderzoek van de geslachtsorganen van zo'n slakje door Wim Maassen toonde aan dat het de Franse duinslak *Cernuella aginnica* betrof. Maar, mogelijk ten gevolge van voor deze soort suboptimale leefomstandigheden op de Groote Heide, betrof de populatie een dwergvorm van die soort met huisjes met een diameter die minder dan de helft was van exemplaren van bijvoorbeeld Domburg (Hannen & Maassen, 2012; Keulen, 2025).

Slakkenrel

In 2024 brak er een ware slakkenrel uit op de Groote Heide. Op waarneming.nl werden meldingen gedaan van vondsten van de Heideslak *Helicella itala*, de Afgevlakte duinslak *Candidula neglecta* en van de Zandslak *Theba pisana*. Die laatste claim kon gedecideerd worden geëlimineerd: op één foto bij de melding was de onderzijde van een exemplaar te zien met een forse navel, bepaald geen kenmerk van de Zandslak. Intense beschouwing van andere exemplaren, eerder op de Groote Heide verzameld door Louis Reutelingsperger en later op 9 juni 2025 door de MSL, gaf geen uitsluitsel over de determinatie. Onze Limburgse malaco-anatoom Wim Maassen was helaas in 2021 overleden. Maar tegenwoordig is er een andere optie om uit lastige determinaties te komen: DNA-barcoding. Gelukkig waren er op 9 juni 2025 behalve lege huisjes ook twee levende slakjes gevonden die in alcohol 96% waren geconserveerd. Eén daarvan werd voor DNA-sequencing van het CO1-gen opgestuurd naar de Taxon Foundation (fig. 2a, b): nu zouden we spoedig het licht zien!

DNA-barcoding

De eerste terugmelding van de Taxon Foundation was enigszins

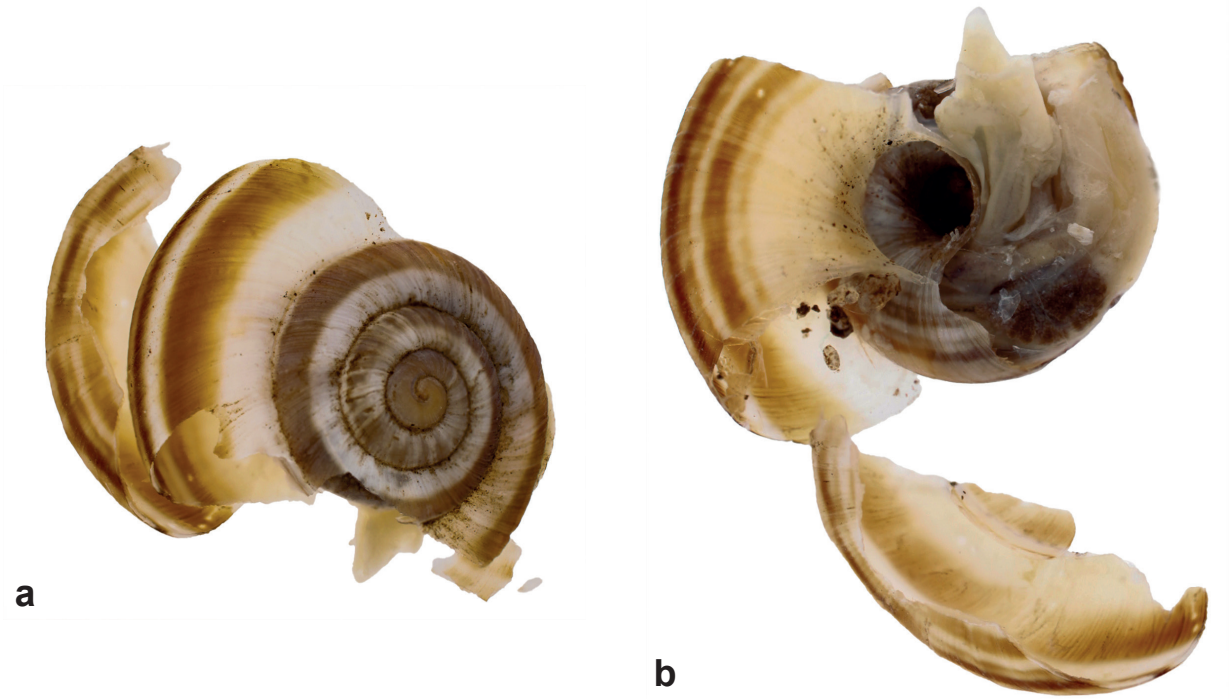

Fig. 2a, b. Restanten van de onbekende slak van de Groote Heide die door Taxon Foundation is gesequenced. De schade is veroorzaakt door het wegnemen van een stukje zacht weefsel voor DNA-extractie. Foto's Lilian Cooper.

verontrustend: het door de polymerase-chain reactie (PCR) gegenereerde signaal was te zwak om een goede vergelijking met DNA-profielen in referentiebanken mogelijk te maken. Maar de trukendoos was nog niet leeg, met inzet van magnetische bolletjes (Rohland & Reich, 2012) konden zogenoemde 'primer-dimers' verwijderd worden, waardoor het signaal duidelijker werd en vergelijking met de DNA-referentiebanken GenBank en BOLD mogelijk werd. In eerste instantie was het bericht: "Al de sequenties van het betreffende exemplaar geven in GenBank en in BOLD een bijna 100% match met *Helicella itala* (en een ca. 98% match met sommige sequenties die aan *Cernuella neglecta* worden toegeschreven)." Het probleem leek opgelost: het slakje van de Groote Heide was *Helicella itala*.

Bij nadere beschouwing…

De eerste auteur verdiepte zich in de details (meer precies: de door de Taxon Foundation aangeleverde sequenties) en schreef voorzichtig: "Er is maar één match met *Helicella itala* (maar niet met allerlei andere *Helicella itala* barcodes) en meerdere matches met *Cernuella neglecta*."

Wat in eerste instantie overtuigd had, was de match van de DNA-sequentie van het slakje van de Groote Heide met een totaal mitochondriaal DNA (GenBank-accessie KT696546.1; Romero *et al.*, 2016) afkomstig van een exemplaar gebruikt door Steinke *et al.* (2004) voor hun artikel: 'Molecular phylogeny and character evolution in the Western Palearctic Helicidae s.l. (Gastropoda: Stylommatophora).' Op dat artikel is later echter stevig commentaar geleverd door Groenenberg *et al.* (2011): Reappraisal of [titel artikel Steinke *et al.*]: 'When poor science meets GenBank'. Groenenberg *et al.* toonden aan dat er voor het artikel van Steinke *et al.* (2004) sequenties gebruikt waren die afkomstig waren van deels verkeerd gedetermineerde exemplaren en sequenties die incorrect in GenBank waren ingevoerd. Waaronder dus mogelijk die van *Helicella itala*!

Daarop heeft de eerste auteur een uitgebreidere analyse van de DNA-gegevens gedaan. Daartoe vergeleek zij de barcodes van de slakjes van Steinke en van de Groote Heide met de volgende beschikbare CO1-barcodes:

- 1x *Helicella itala* en 1x *Cernuella neglecta* uit Limburg, verzameld door Gerard Majoor en gebarcodeerd door Arise;
- 9x *Helicella itala* van museum-exemplaren uit Noordwest-Europa uit de openbare DNA-databank BOLD. Er werd gekozen voor museum-exemplaren omdat de determinaties daarvan doorgaans betrouwbaarder zijn;
- 8x *Cernuella neglecta* uit de openbare DNA-databank BOLD. Er was slechts één museum-exemplaar van deze soort in de databank, de rest van de beschikbare barcodes waren in BOLD overgenomen uit de DNA-database Genbank;
- 1x *Xeroplecta intersecta* van Terschelling, verzameld door Sylvia van Leeuwen en gebarcodeerd door Arise. Dit profiel is toegevoegd om de verwantschapsboom te 'wortelen' (dat betekent: de verwantschapsboom van een leesrichting te voorzien);

De uitkomst van de vergelijking is weergegeven in een verwantschapsboom (fig. 3). Daarin vallen meerdere zaken op:

Ten eerste: het slakje van de Groote Heide is genetisch vrijwel gelijk aan *Cernuella neglecta*'s uit Eckelrade (Limburg), Frankrijk en Duitsland, en totaal niet verwant met *Helicella itala*. Dit geldt ook voor de slak gebruikt door Steinke *et al.*: deze is verkeerd gedetermineerd en betreft evident ook een *Cernuella neglecta*.

Ten tweede: de barcodes van *Cernuella neglecta* in Noordwest-Europa vallen uiteen in twee groepen. De onderste drie exemplaren van *Cernuella neglecta* in figuur 3 (twee uit Frankrijk en één van onbekende herkomst) zijn genetisch zo anders

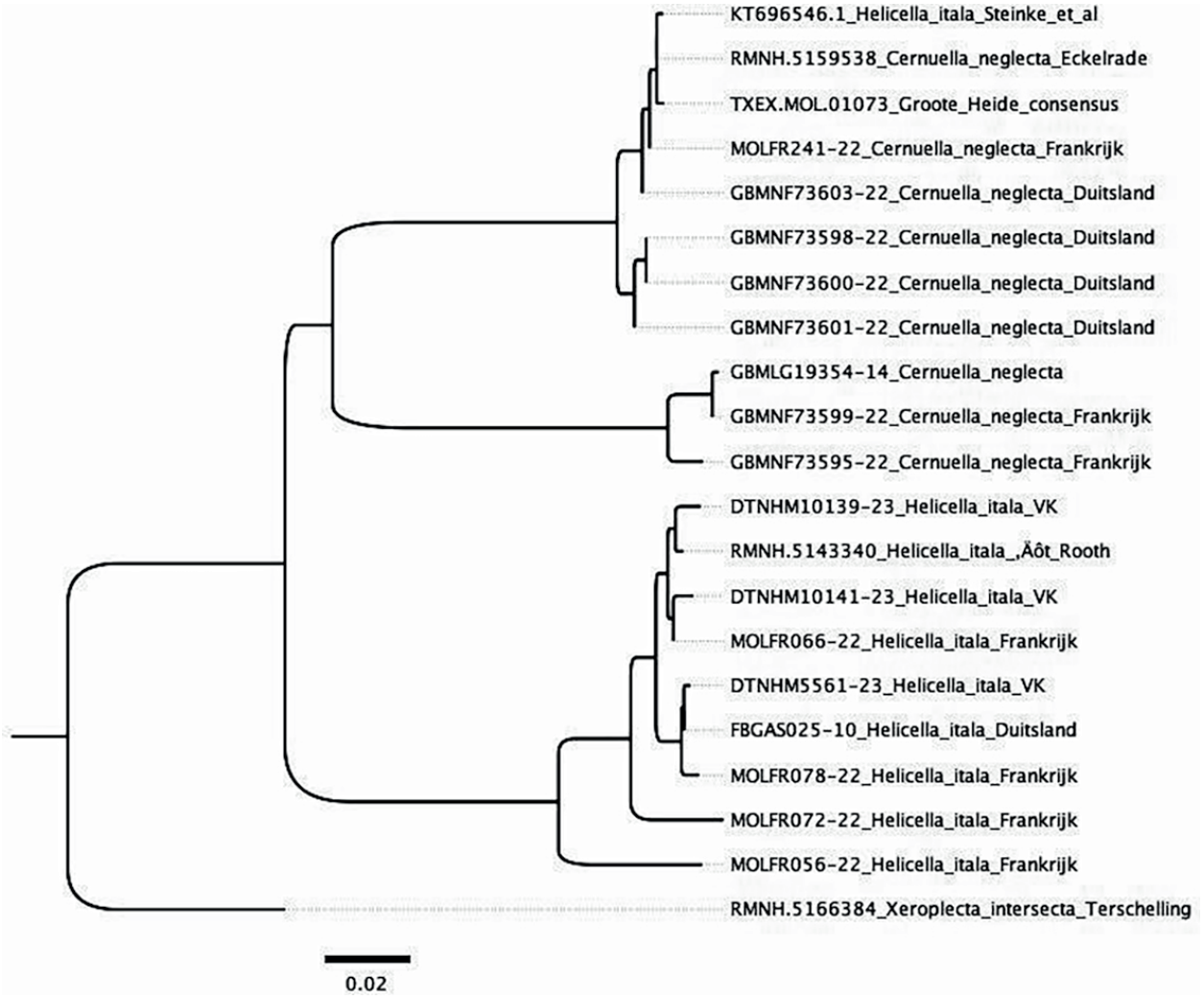

Fig. 3. De verwantschapsboom waarin de barcodes van de slakjes van de Groote Heide en van Steinke *et al*. vergeleken zijn met barcodes van *Cernuella neglecta* en *Helicella itala* uit Noordwest-Europa. De maatstreep geeft de mate van moleculaire verandering langs iedere horizontale tak; hier 2%..

dat ze mogelijk niet tot dezelfde soort behoren als de andere *Cernuella neglecta*'s. De divergentie bedraagt 17-18 %. Mocht dat inderdaad het geval zijn, dan moet nog nader onderzocht worden welk van de twee clusters de 'echte' *Cernuella neglecta* betreft. Ook de barcodes van *Helicella itala* van Noordwest-Europa vertonen onderling variatie, maar minder groot dan die van *Cernuella neglecta*. Alleen de onderste *Helicella itala* in figuur 3 verschilt genetisch iets meer dan 5% van zijn soortgenoten.

In een (niet getoonde) uitgebreidere analyse hebben we ook sequenties van deze twee soorten uit Zuid-Europa en de Pyreneeën betrokken. Daarbij werd het beeld nog een stuk complexer, en bleek ook *Helicella itala* uiteen te vallen in verschillende clusters die wel onderling genetisch sterk overeenkomen, maar duidelijk verschillen van andere clusters. Vermoedelijk gaat het hier dus om soortcomplexen die verder opgesplitst zouden moeten worden. In het kader van dit artikel gaat het echter te ver om dat uit te zoeken. Ook geven we hier geen antwoord op de vraag welk cluster de 'echte' soort *Helicella itala* vertegenwoordigt.

Kortom: 'het slakje van de Groote Heide' is uiteindelijk toch te determineren als de Afgevlakte duinslak *Cernuella neglecta* (en dan wel de Noordwest-Europese variant daarvan) (fig. 4) en is zeker geen Heideslak *Helicella itala*!

Epiloog

Het bepalen van DNA-barcodes van organismen, zoals slakken, kan helpen om knellende determinatieproblemen op te lossen. Zo wordt wel gezegd: "Nog even en we hebben een DNA-metertje dat je in de slak of ander dier stopt en de naam rolt eruit". Zo simpel is het dus voorlopig niet. Cruciaal is dat de DNA-sequenties van de lastig te determineren exemplaren in een DNA-referentiebank vergeleken kunnen worden met sequenties die verifieerbaar afkomstig zijn van een correct gedetermineerde soort. Voor GenBank is dit helaas niet altijd het geval: slechts de door de auteur ingediende determinatie wordt als taxonomische aanduiding gehanteerd. Een eerder gemaakte fout kan achteraf helaas alleen door de oorspronkelijke auteur(s) worden gecorrigeerd, en een 'foute' referentiecode waarnaar al door derden is verwezen mag ook niet alsnog verwijderd worden (Groenenberg *et al*., 2011). Om die redenen is een nieuwe DNA-databank opgezet, de Barcoding of Life Database (BOLD), waarbij de kwaliteitscontrole veel secuurder is: sequenties worden vergezeld van afbeeldingen van het geanalyseerde exemplaar en de ingediende sequenties zijn veel vaker dan bij GenBank afkom-



Fig. 4. Juveniel exemplaar van de Afgevlakte duinslak *Cernuella neglecta* van de Groote Heide. Maatstreep is 5 mm. Foto's Ingrid Margry.

stig van museumexemplaren die door experts op naam zijn gebracht. Toch begint ook bij BOLD het percentage determinatiefouten toe te nemen. Ook daar kan alleen de oorspronkelijke auteur de determinatie wijzigen. Het wachten is daarom op een aanvullende databank waarin slechts sequenties van type-exemplaren zijn opgenomen (Sánchez *et al*., 2022), of een databank waarin reviewers kanttekeningen kunnen plaatsen bij de determinatie door de oorspronkelijke auteur, zodat toekomstige gebruikers gewaarschuwd zijn. Voorzichtigheid met het trekken van conclusies uit vergelijkingen van DNA-barcodes blijft dus geboden.

Verder blijkt uit dit voorbeeld dat eenvoudig onderzoek in DNA-databanken al meerdere onvolkomenheden in de taxonomie aan het licht kan brengen. Slakken die volgens de huidige taxonomische inzichten correct gedetermineerd zijn als *Helicella itala* respectievelijk *Cernuella neglecta* kunnen elk – gezien de grote genetische verschillen – wellicht tot een groter aantal soorten behoren. Er is dus nog nuttig werk te doen voor iemand die zich verder in de taxonomie van deze soorten wil verdiepen.

Dankwoord

Dank aan Stef Keulen, Jan Koert en Louis Reutelingsperger voor het zoeken naar slakjes op de Groote Heide bij Venlo en het scoren van twee levende exemplaren. Dank ook aan Jan Hermans voor een kopie van het rapport van 1997 over de Groote Heide. Henk van der Meulen (Waterschap Friesland) wordt bedankt voor het beschikbaar stellen van magnetische bolletjes en de bijbehorende protocollen; dank ook aan Stef Keulen voor zijn foto van de Groote Heide, aan Lilian Cooper van Taxon Foundation voor de foto's van het voor het sequensen gekraakte slakkenhuisje en aan Ingrid Margry voor de foto's van een juveniel exemplaar van Afgevlakte duinslak van de Groote Heide. Dank ook aan Naturalis Biodiversity Center voor het gebruik van gegevens die voorkomen uit het programma Arise (NWO Roadmap grant number 2020/ENW/00901156) waarbinnen een DNA-databank van (onder andere) Nederlandse slakken wordt gecreëerd. Daardoor kon een betrouwbare vergelijking met slakken uit eigen land gemaakt worden.

Geraadpleegde bronnen

Coolen, F.C.M., 1998. De flora van de Groote Heide. – Natuurhistorisch Maandblad 87(1): 3-10.

Eenhuistra, P., 2017. Fliegerhorst Venlo. In: R. Akkermans *et al.* (red.), Natuur voor elkaar - in het Grenspark Maas-Swalm-Nette. – Stichting Natuurpublicaties Limburg, Maastricht: p. 33.

Groenenberg, D.S.J., E. Neubert & E. Gittenberger, 2011. Reappraisal of "Molecular phylogeny and character evolution in the Western Palearctic Helicidae s.l. (Gastropoda: Stylommatophora)": When poor science meets GenBank. – Molecular Phylogenetics and Evolution. Doi:10.1016/j.ympev.2011.08.024.

Hannen, J. & W. Maassen, 2012. De Franse duinslak *Cernuella aginnica* (Locard, 1882) op de Groote Heide bij Venlo. – Spirula 384: 10-11.

Hermans, J.T. & P.L.L. Thomas, 1997. De Groote Heide. Flora- en faunakartering. Beheersvisie. – Rapport Natuurhistorisch Genootschap in Limburg, Roermond in opdracht van de Gemeente Venlo.

Keulen, S., 2025. Slakken van de Groote Heide. In: R. Akkermans *et al.* (red.), De Maasduinen, natuurlijk Noord-Limburg. Stichting Natuurpublicaties Maastricht: 390.

Rohland, N. & D. Reich, 2012. Cost-effective, high-throughput DNA sequencing libraries for multiplexed target capture. – Genome Research 22(5): 939-946.

Romero, P.E., A.M. Weigand & M. Pfenninger, 2016. Positive selection on panpulmonate mitogenomes provide new clues on adaptations to terrestrial life. – BMC evolutionary biology 16(1): 164.

Sánchez-C., D., J.E. Richardson, M. Hart, J. Serrano, D. Cardenas, M.A. Gonzalez & R. Cortés-B, 2022. A plea to DNA barcode type specimens: An example from *Micropholis* (Sapotaceae). – Taxon 71(1): 154-167.

Steinke, D., Ch. Albrecht & M. Pfenninger, 2004. Molecular phylogeny and character evolution in the Western Palearctic Helicidae s.l. (Gastropoda: Stylommatophora). – Molecular Phylogenetics and Evolution 32(3): 724-734.

Van Beek, S., 2025. Groote Heide Venlo. In: R. Akkermans *et al.* (red.), De Maasduinen, natuurlijk Noord-Limburg. Stichting Natuurpublicaties Maastricht: 376-391.

Adressen van de auteurs

fbsylvia@xs4all.nl
gmajoor87@gmail.com
menno.schilthuizen@naturalis.nl