

Université de Montréal

Une invasion dans la discrétion ; répartition, origines et
expansion des limaces européennes du complexe
d'Arion subfuscus s. l. au Québec

par Érik L'Heureux

Département de Sciences Biologiques
Faculté des Arts et Sciences

Mémoire présenté
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès sciences
en Sciences Biologiques

Septembre 2016

© L'Heureux, 2016

Résumé

Une identification précise des espèces exotiques est essentielle afin de déterminer la nature et l'ampleur des impacts que ces espèces auront sur leurs nouveaux habitats. Le complexe d'*Arion subfuscus s. l.*, originaire d'Europe, fait partie des limaces les plus abondantes dans le nord-est de l'Amérique du Nord et plusieurs impacts dus à leur présence ont été rapportés. Cependant, l'identité des espèces introduites demeure inconnue dans la plupart des régions. L'objectif de ce projet est donc de déterminer la répartition récente, la diversité taxonomique et l'origine des membres du complexe d'*A. subfuscus s. l.* au Québec en se basant sur leur identité mitochondriale (16S rDNA). Un total de 526 spécimens provenant de 68 sites à travers le Québec et un site en Nouvelle-Écosse ont été analysés à l'aide de la technique des SSCP et leurs séquences ont été déterminées. Huit haplotypes de deux espèces allopatriques, *A. fuscus* et *A. subfuscus s. s.* (lignées S1 et S2) ont été détectés. Les résultats confirment que des limaces provenant de régions distinctes d'Europe ont été introduites à de multiples reprises. Une comparaison avec des données historiques de répartition a révélé une expansion fulgurante de la répartition depuis les 50 dernières années. *Arion fuscus* est la principale espèce envahissante qui a été détectée dans toutes les régions échantillonnées, ce qui contraste avec les études antérieures réalisées ailleurs en Amérique du Nord. Le rôle potentiel des échanges commerciaux internationaux dans l'histoire d'introduction des espèces exotiques est discuté.

Mots-clés : Allopatrie, *Arion fuscus*, *Arion subfuscus*, exotique, expansion de la répartition, haplotypes mitochondriaux, invasion, invasive, lignées mitochondriales, limace, séquençage, SSCP.

Abstract

Accurate identification of exotic species is required to assess the magnitude and nature of consequences on their new habitats. The *Arion subfuscus s. l.* species complex comprised slugs of European origins that are amongst the most abundant slug species in northeastern North America and various impacts of their presence are reported. However, the identities of the species introduced remain unknown in most regions. This study aims at determining the current distribution, taxonomic identity and the origins of the members of the *A. subfuscus s. l.* complex in Quebec (Canada) based on mitochondrial 16S rDNA. A total of 526 specimens from 68 locations throughout Quebec and one site in Nova Scotia were SSCP analysed and their sequences were determined. Eight haplotypes of the allopatric *A. fuscus* and *A. subfuscus s. s.* (lineages S1 and S2) were detected. Results confirmed that slugs from distinct European regions were introduced multiple times. Comparison with previous survey revealed an impressive expansion of the distribution during the last 50 years. *Arion fuscus* is the major invasive species found throughout Quebec, contrasting with previous North American studies. The potential role of international trade in the introduction history of exotic species is discussed.

Keywords: Allopatry, *Arion fuscus*, *Arion subfuscus*, distribution expansion, exotic, invasion, invasive, mitochondrial haplotypes, mitochondrial lineages, slug, sequencing, SSCP.

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	v
Liste des figures.....	vi
Liste des abréviations.....	vii
Remerciements.....	ix
Introduction.....	1
Les espèces exotiques envahissantes.....	1
Le succès des espèces exotiques envahissantes.....	2
Le cas des complexes d'espèces à faible capacité de dispersion active.....	3
Dispersion des gastéropodes terrestres.....	4
Les limaces du genre <i>Arion</i>	7
Le complexe d' <i>Arion subfuscus s. l.</i> en Amérique du Nord.....	8
Le complexe d' <i>Arion subfuscus s. l.</i> en Europe.....	10
Les membres du complexe d' <i>Arion subfuscus s. l.</i> en Amérique du Nord.....	11
Aire d'échantillonnage.....	12
Objectifs.....	13
Chapitre 1: A discrete Invasion: Distribution, Origins and Expansion of the European slug complex <i>Arion subfuscus s. l.</i> in Quebec.....	15
Introduction.....	16
Methodology.....	20
Results.....	23
Genetic identification of specimens.....	23
Geographical distribution.....	28
Spatial organisation.....	30
Discussion.....	31

Origins.....	31
Distribution expansion of the <i>Arion subfuscus s. l.</i> complex.....	33
Mitochondrial diversity, distribution and modes of dispersion	34
Conclusion	36
Acknowledgements.....	38
Appendix I	39
Distribution of <i>Arion subfuscus s. l.</i> species complex in Quebec as determined by Chichester and Getz (1969) compared to the distribution revealed in the present study.....	39
Discussion.....	41
Abondance des espèces trouvées	41
Origines.....	44
Expansion du complexe	47
Allopatrie	48
Diversités taxonomiques liées aux activités humaines	48
Limites de l'études et questions soulevées	49
Bibliographie.....	i

Liste des tableaux

Table 1. Sequences from Genbank corresponding to the haplotypes detected in Quebec and Nova Scotia.	24
Table 2. Geographic coordinates (decimal degrees) of the sampling sites and numbers of specimens of each haplotype collected.	25

Liste des figures

- Figure 1. Map of sampling sites. Sampling sites are numbered (1 to 69). Note the circled region where a higher density of sites was sampled (sites 37 to 64) in a less than 20 km radius..... 21
- Figure 2. Presence of *Arion fuscus* in sampled sites. Sites where *Arion fuscus* was detected: haplotypes A (◆), F-32 (▲), C (■), both A and F-32 (▲), both A and C (▨), as well as both A and Johnville (◇). Sites where *A. fuscus* was not detected, but other species of the complex are also indicated (●). 28
- Figure 3. Presence of *Arion subfuscus* s. s. in sampled sites. Sites where *Arion subfuscus* s. s. was detected: haplotypes S1-10 (▲), both S1-03 and S1-10 (▲), S2-02 (■), S2-07 (●), both S2-02 and S2-07 (▨), as well as both S2-07 and S1-10 (◇). Sites where *A. subfuscus* s. s. was not detected, but other species of the complex were, are also indicated (●). 29
- Figure I.1. Distribution of the *Arion subfuscus* s. l. species complex in Quebec as determined by Chichester and Getz (1969) compared to the distribution revealed in the present study. ... 40

Liste des abréviations

16S rDNA	ADN ribosomique 16S / 16S ribosomal DNA
<i>A.</i>	<i>Arion</i>
COI	Cytochrome c oxidase 1
dNTP	désoxynucléotide triphosphate / deoxynucleotide triphosphate
<i>et al.</i>	et les autres auteurs / and others (<i>et alii</i>)
ITS1	Internal transcribed spacer 1
µL	microlitre / microliter
µmol/L	micromol par litre / micromoles per liter
ng	nanogramme / nanogram
nmol/L	nanomol par litre / nanomoles per liter
pb	paire de base / base pair (bp)
PCR	polymerase chain reaction
p-value	probabilité / probability
<i>s. l.</i>	sens large (<i>sensus lato</i>)
<i>s. s.</i>	sens stricte (<i>sensus stricto</i>)
SSCP	Polymorphisme de Conformation des Simples Brins / Single Strand Conformation Polymorphism
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
10x	Dix fois concentré / concentrated ten times

“For many reasons *Arion subfuscus* has proved to be the most interesting and, potentially, the most important introduced slug.”

-Chichester et Getz (1969)

Remerciements

Je remercie tout d'abord toutes les personnes qui ont contribué à me fournir des spécimens et qui ont participé à leur collecte, plusieurs personnes avec lesquelles de belles collaborations sont nées. Il s'agit de : Andrée Nault, Lauriane Monette, Valérie Deschênes, Maxime Tremblay, Charles-Antoine Besner, Amélie Lafrance, Émilie Roy, Carl Savignac, Élisabeth Gagnon, Alexia Leinenweber, Isabelle Beaudoin-Roy, Sophie Breton, Kevin Duclos, Christelle Leung, France Beauregard, Simon Bourbeau, Bernard Angers, Camille Marier-Desroches, Angélique Dupuch, Isabelle Picard, Pauline Dubé, Roland Vergilino, Denis Lavergne et Sandrine Harrison. Sans ces collecteurs, ce projet n'aurait jamais pu avoir lieu. J'aimerais aussi remercier toutes les personnes qui m'ont donné accès à leur terrain pour mon échantillonnage, souvent sans même me connaître.

Durant la maîtrise, j'ai reçu une bourse du Fond de Recherche du Québec (FRQNT), du Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie du Canada (CRSNG) et du Fond de Bourses en Sciences Biologiques (FBSB) de l'Université de Montréal. La recherche a été appuyée par des fonds provenant du Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie du Canada (CRSNG).

J'aimerais remercier les membres du laboratoire de Bernard Angers avec qui j'ai passé énormément de temps durant ces trois dernières années. Parmi les gens du laboratoire, j'adresse un mot particulier à Hinatea Ariey que j'ai eu la chance de superviser deux fois dans le cadre d'initiations à la recherche. Sa minutie, sa patience et son travail soigné me laissent présager une carrière prometteuse. Aussi, j'aimerais remercier Kevin Duclos avec qui j'ai eu le bonheur de travailler et avec qui des collaborations sont nées durant mon projet de maîtrise.

Également, j'aimerais souligner la contribution de Roland Vergilino, qui m'a appris les rudiments du séquençage et des SSCP, ainsi que l'émerveillement face à un gel bien révélé.

Un merci tout particulier est adressé ici à mon superviseur, Bernard Angers, qui m'a donné la liberté de pouvoir travailler sur le modèle incroyable que constitue les limaces. Cette ouverture aura été pour moi une chance inespérée d'allier passion et travail dès le début de ma vie de biologiste. J'aimerais aussi remercier François-Joseph Lapointe mon co-directeur dans ce projet de maîtrise.

Lors de mes tous débuts avec le monde de la malacologie, une personne qui croyait en moi m'a donné sa loupe binoculaire en me disant que ce cadeau me serait utile pour ma carrière de malacologiste. Tu avais raison Sylvie Deslauriers.

Jamais je ne pourrai remercier à leur juste valeur mes parents, Lynda Côté et Mario L'Heureux, ainsi que mon frère, Frédéric L'Heureux, et c'est pourquoi ce mémoire leur est dédié. Ces gens ont su croire en ma folie et l'ont toujours encouragée. L'aide morale, matérielle et humaine qu'ils m'ont apportée m'aura permis d'espérer avoir ma place dans le monde de la recherche.

Finalement, en signe de respect, j'aimerais remercier les nombreuses limaces qui ont été sacrifiées pour cette étude. Puisse ce mémoire être le début d'un intérêt grandissant pour le monde des limaces.

Introduction

Les espèces exotiques envahissantes

Les espèces exotiques envahissantes représentent une menace à la fois pour la biodiversité et l'économie ; elles seraient la seconde menace en importance pour la biodiversité (Wilcove *et al.* 1998, Union internationale pour la conservation de la nature 2011) et ces espèces sont associées à des pertes économiques de plusieurs milliards de dollars par année au Canada seulement (Environnement Canada 2012). De nombreuses études de cas rapportent l'impact que les espèces exotiques ont sur les écosystèmes dans lesquels elles sont introduites. Un exemple célèbre de mollusque en Amérique du Nord, qui modifie certaines caractéristiques de son environnement et nuit aux espèces indigènes de moules, est la moule zébrée (*Dreissena polymorpha*) (Holland 1993, Ricciardi, Neves et Rasmussen 1998). En effet, les espèces introduites auront à développer de nouvelles interactions biotiques et abiotiques dans leur nouvel environnement, et ce faisant, en modifieront les dynamiques (e.g. Bohlen *et al.* 2004, Meirmans *et al.* 2010, Wood *et al.* 2015;). Malgré le fait qu'il y ait de la controverse quant aux impacts réels de ces espèces sur l'extinction d'espèces indigènes (Gurevitch et Padilla 2004), leur succès écologique reste étonnant. En effet, les espèces exotiques envahissantes sont des espèces qui s'établissent dans des milieux arborant des conditions nouvelles, mais réussissent tout de même à se maintenir, puis augmenter leur répartition de façon, parfois même à nuire aux espèces locales et à induire des changements au niveau du milieu dans lequel elles s'établissent (e.g. Holland 1993, Ricciardi, Neves et Rasmussen 1998).

Le succès des espèces exotiques envahissantes

Le succès d'introduction et d'invasion d'une espèce exotique dépendent en grande partie des attributs génétiques et/ou épigénétiques des individus introduits, bien que ces derniers diffèrent grandement selon les espèces (Tsutsui *et al.* 2000, Lavergne et Molofsky 2007, Gao *et al.* 2010). En effet, plusieurs cas sont possibles. Par exemple, certaines populations introduites auront une plus grande diversité génétique que les populations indigènes (Lavergne et Molofsky 2007), bien que généralement ce soit le contraire qui se produise (Dlugosh et Parker 2008). Mais même sans diversité génétique, des différences épigénétiques peuvent permettre aux organismes d'occuper différents environnements (Gao *et al.* 2010).

Généralement, les populations introduites vont subir une perte de diversité génétique plus ou moins importante par rapport aux populations d'origine. Ce constat, appelé effet fondateur, résulte du petit nombre d'individus de la population d'origine qui seront introduits au départ (Dlugosch et Parker 2008). Cependant, cette perte de diversité génétique n'est pas nécessairement négative et peut même être un déterminant du succès écologique d'une espèce exotique. C'est le cas notamment chez la fourmi argentine (*Linepithema humile*) (Tsutsui *et al.* 2000). Chez cette espèce, plus le nombre d'allèles partagés entre les individus de nids différents est élevé, plus le niveau d'agression sera faible lorsque ces individus vont se rencontrer. Ainsi, dans les populations introduites dans le sud des États-Unis qui ont subi un effet fondateur, les individus de nids différents vont se mélanger et former des « super-colonies ». La fourmi argentine est donc souvent l'espèce de fourmi dominante dans les régions où elle a été introduite. À l'opposé, la diversité génétique peut être plus élevée dans les populations introduites que les populations indigènes grâce à des introductions multiples d'origines variées

tel qu'observé chez certaines espèces exotiques comme chez la graminée *Phalaris arundinacea* (Lavergne et Molofsky 2007).

Déterminer la provenance des génotypes introduits est un premier pas déterminant pour comprendre le succès de leur invasion. En effet, des génotypes de provenances différentes pourraient avoir des caractéristiques écologiques et des capacités d'invasion différentes. De plus, dans le cas d'introductions multiples, de nouveaux génotypes et des combinaisons d'allèles nouvellement produits pourraient constituer une partie du succès d'invasion de ces espèces (Lavergne et Molofsky 2007). Connaître les populations sources est donc essentiel pour pouvoir comprendre les changements évolutifs des espèces exotiques (Keller et Taylor 2008). Lorsque l'origine des populations introduites ne peut pas être détectée par observation directe, des méthodes moléculaires peuvent être utilisées (Pinceel *et al.* 2005c).

Le cas des complexes d'espèces à faible capacité de dispersion active

Une identification précise des espèces exotiques est nécessaire afin d'évaluer la nature et l'ampleur de leurs impacts sur leurs nouveaux habitats. Ainsi, les complexes d'espèces posent un problème particulier, puisque plusieurs espèces aux caractéristiques écologiques distinctes seront potentiellement considérées comme une seule espèce (Bickford *et al.* 2007, Rowson *et al.* 2014).

La répartition des espèces exotiques est fortement liée aux activités humaines (Taylor et Irwin 2004), donc les régions avec des histoires d'introduction différentes peuvent contenir des lignées différentes. Par conséquent, les données écologiques sur les complexes d'espèces d'une région particulière ne peuvent pas être généralisées à d'autres régions en l'absence d'identification fiable. Quand, en plus, les taxons introduits ont une capacité de dispersion active fortement

limitée, il est attendu que l'expansion de leur répartition sera continue et très lente, et suivra en plus un patron de distribution discontinu (*stepping-stone*) lorsque la dispersion s'effectue par des moyens passifs, tel que le transport via les activités humaines (Suarez, Holway et Case 2001). Par conséquent, la répartition des espèces exotiques dont la capacité active de dispersion est lente sera d'autant plus reliée aux activités anthropogéniques à une échelle spatiale large. Les limaces sont justement des exemples d'organismes relativement lents.

Dispersion des gastéropodes terrestres

Les gastéropodes terrestres ont une dispersion active très limitée. Par exemple, en trois mois de suivi, Baur et Baur (1990) ont déterminé que le déplacement moyen de l'escargot *Arianta arbustorum* allait de 1,5 à 4,9 mètres parcourus. L'individu s'étant le plus déplacé avait parcouru une distance de 14 mètres. De plus, des barrières tels que les routes ou les sentiers peuvent restreindre leurs déplacements (Baur et Baur 1990). Il faudrait ainsi plus de 2000 ans pour parcourir 100 km à raison de 50 m par an ; 4000 ans si l'hiver limite les déplacements durant la moitié de l'année.

Ainsi, pour les déplacements à grande échelle, les modes de dispersion passifs sont nécessairement impliqués. Plusieurs moyens de dispersion passifs ont été proposés ou observés (Dörge *et al.* 1999). La dispersion par le vent a été proposée pour les espèces d'escargots terrestres de très petite taille, c'est-à-dire de quelques millimètres de largeur (Vagvolgyi 1975, Kirchner *et al.* 1997, Dörge *et al.* 1999). Il a d'ailleurs été montré de façon théorique que certaines espèces pourraient être dispersées de plusieurs kilomètres par ce moyen lors de fortes tempêtes (Kirchner *et al.* 1997). En plus du transport d'individus par le vent, divers objets (par exemple, les feuilles mortes) sur lesquels ces gastéropodes se trouvent peuvent aussi être

déplacés par le vent (Dörge *et al.* 1999). Certaines espèces d'escargots terrestres peuvent également être dispersés par le courant de l'eau ou par le transport de divers débris emportés par le courant (Dörge *et al.* 1999, Hornung *et al.* 2003).

La présence de gastéropodes terrestres sur d'autres animaux a été observée. Par contre, ce mode de dispersion reste à être documenté, car son importance chez les gastéropodes terrestres est inconnue et ne se base principalement que sur des observations ponctuelles. Parmi celles-ci, Rees (1965) rapporte quelques observations de transport d'escargots sur des insectes. Cependant, cet auteur estime que ce moyen de transport serait peu susceptible de permettre une dispersion à de grandes distances. Le transport d'escargots et de limaces terrestres pourrait aussi être possible via les oiseaux. Les observations faites incluent, par exemple, le transport de matériel pour la construction du nid (Maciorowski *et al.* 2012) ou le transport d'escargots et de limaces pour l'alimentation des oisillons (Shikov et Vinogradov 2013). En Amérique du Nord, deux individus de deux espèces de limaces (*Arion subfuscus s. l.* et *Deroceras reticulatum*) ont été trouvées dans le plumage d'oiseaux (Pearce *et al.* 2012). Bien que peu documenté chez les escargots terrestres, certains oiseaux semblent d'importants vecteurs chez certaines espèces de gastéropodes aquatiques (Boag 1986, Wesselingh *et al.* 1999). La dispersion par les mammifères pourrait aussi être considérée puisque des espèces d'escargots terrestres ont été trouvées dans la fourrure d'animaux domestiques (Fischer *et al.* 1996, Dörge *et al.* 1999).

L'importance des activités humaines dans la dispersion des gastéropodes terrestres est largement documentée (Godan 1983, Dörge *et al.* 1999). Si certaines espèces ont été introduites de façon volontaire, la majorité des espèces de gastéropodes introduits ont été des accidents d'où la présence de nombreuses espèces jugées indésirables (Godan 1983). Les échanges commerciaux internationaux sont ainsi d'une importance majeure dans l'introduction de plusieurs espèces

(Godan 1983, Robinson 1999). Entre 1993 et 1998, plus de 4900 individus de gastéropodes terrestres et aquatiques ont été interceptés aux États-Unis par le Département d'agriculture dans divers produits importés (Robinson 1999). Parmi ceux-ci, les produits horticoles, c'est-à-dire les plantes horticoles et les fleurs coupées, représentaient environ 29% des interceptions de gastéropodes, suivi des tuiles (23%), des conteneurs (16%) et de la nourriture (fruits, légumes et fines herbes ; 7%), tous des produits ou des objets principalement susceptibles de transporter des espèces terrestres (Robinson 1999). Au Canada, de façon similaire, entre 1963 et 1967, plusieurs gastéropodes ont été interceptés, principalement dans des plantes importées (Godan 1983). Dans les deux cas, le transport d'autres types de produits est également en cause, mais de façon beaucoup moins importante (Godan 1983, Robinson 1999).

En plus du transport involontaire intercontinental des gastéropodes dû aux échanges commerciaux internationaux, la dispersion passive via les activités humaines est également possible à l'intérieur d'un continent ou d'un pays. Par contre, lors de déplacements à l'intérieur des frontières d'un pays, les inspections pour détecter la présence de gastéropodes sur les marchandises sont beaucoup plus rares. Par conséquent, les gastéropodes transportés ne sont pas répertoriés et les observations directes sur les produits transportés sont rares. Les chances d'être transportés à l'intérieur des frontières d'un pays sont donc plus élevées qu'entre les pays, même si les observations directes sont plus limitées. En Europe, la dispersion de plusieurs espèces sur de grands territoires a été observé dans des laps de temps relativement courts, ce qui selon Godan (1983) pourrait être attribuée à une augmentation des échanges commerciaux depuis le 19^{ème} siècle et du transport routier et ferroviaire en Europe. Godan (1983) rapporte d'ailleurs l'expansion rapide de plusieurs espèces de limaces entre 1915 et 1959 en Suède (résultats de Waldén 1965). Chichester et Getz (1969) suggèrent que la dispersion passive des limaces

exotiques dans le nord-est de l'Amérique du Nord est principalement due au transport de plantes, mais que le transport de sol et bois pourrait aussi être en cause. Certaines espèces exotiques, comme *Arion subfuscus s. l.*, ont été trouvées dans des habitats naturels où les chances d'avoir été introduits via les activités humaines sont moindres. Chichester et Getz (1969) ont donc suggéré qu'en plus de la dispersion passive qui permet le transport des limaces sur de grandes distances, la dispersion active était importante pour certaines espèces afin de pénétrer dans les habitats naturels. En se basant sur des analyses génétiques mitochondriales, il a été montré que les spécimens récemment trouvés en Californie de la limace européenne *A. subfuscus s. l.* provenaient probablement du nord-est des États-Unis (McDonnell *et al.* 2009).

Les limaces du genre *Arion*

En Amérique du Nord, le tiers des espèces exotiques de gastéropodes terrestres sont des limaces (Nekola 2014). Parmi celles-ci, le genre *Arion* se démarque (Nekola 2014). Ce sont des limaces d'origine paléarctique (Kerney et Cameron 2006, Sysoev et Schileyko 2009) dont le genre comprend environ une trentaine d'espèces dont plusieurs ont un statut taxonomique non résolu (Quinteiro *et al.* 2005, Rowson *et al.* 2014). Leur identification est difficile et requiert souvent des dissections ou des méthodes moléculaires. D'ailleurs, un large inventaire des limaces de Grande-Bretagne et d'Irlande, dont l'identification a été assistée par des méthodes moléculaires (Rowson *et al.* 2014), a permis d'identifier de nouvelles espèces et ainsi augmenter le nombre d'espèces connues de plus de 20% sur ce territoire.

En Amérique du Nord, au moins neuf espèces d'*Arion* ont été introduites (Barr *et al.* 2009, Grimm *et al.* 2009). Certaines de ces espèces sont d'anciennes introductions avec des mentions remontant à la première moitié des années 1800 (Binney 1842, Pilsbry 1948), avec quelques

identifications erronées dans la littérature nord-américaine (déterminé par Pilsbry 1948). De plus, plusieurs espèces sont comprises dans des complexes d'espèces seulement identifiables par dissections ou méthodes moléculaires. Étant donné leur identification difficile et le fait que les limaces soient généralement perçues comme des organismes peu charismatiques, ce groupe n'a pas reçu l'attention accordée à d'autres groupes d'animaux exotiques (Regnier, Fontaine et Bouchet 2009, Nekola 2009). En effet, chez certains organismes tels que les papillons (e.g. Liebhold, Halverson et Elmes 1992, Hight *et al.* 2002), les oiseaux (e.g. Wehtje 2003) ou même d'autres mollusques aquatiques telle que la moule zébrée (e.g. Johnson et Carlton 1996) des données ont été amassées au cours de l'expansion de la répartition de plusieurs espèces.

Le complexe d'*Arion subfuscus s. l.* en Amérique du Nord

Le complexe d'*A. subfuscus s. l.* est composé de limaces natives d'Europe, qui compte parmi les limaces les plus communément rencontrées en Amérique du Nord, particulièrement dans le nord-est (Chichester et Getz 1969). En Amérique du Nord, la première mention du complexe d'*Arion subfuscus s. l.* a été attribuée à Binney (1842), aux alentours de Boston, par Chichester et Getz (1969). Ceux-ci se sont fiés à une description écrite d'un spécimen qui avait été identifié comme étant une autre espèce. Cependant, bien que plusieurs auteurs aient assumé par la suite qu'il s'agissait de la première mention de cette espèce en Amérique de Nord (e.g. Pinceel *et al.* 2005c), la description faite de la coloration et de la taille ne permet pas de déterminer avec certitude qu'il s'agisse du complexe d'*Arion subfuscus s. l.* et pourrait être attribué à des spécimens de grande taille d'autres espèces tels que le complexe d'*A. fasciatus*. Chichester et Getz (1969, 1973) ont émis comme hypothèse que l'espèce avait été introduite à de multiples reprises en Amérique du Nord, puisque dans différentes populations, les individus présentaient

des patrons de coloration différents qui ne changeaient pas même lorsque les individus étaient gardés en captivité. Également, en se basant sur des données d'allozymes, deux modes de reproduction ont été proposés, soit la fécondation croisée et l'autofécondation (McCracken et Selander 1980).

La répartition du complexe d'*A. subfuscus s. l.* en Amérique du Nord est assez large. Des mentions de ces limaces ont été faites dans l'est : du Manitoba jusque dans les Maritimes (incluant Terre-Neuve) au Canada, ainsi que de la Nouvelle-Angleterre jusqu'à la Caroline du Sud aux États-Unis (Pilsbry 1948, Chichester et Getz 1969, Gleich et Gilbert 1976, Grimm *et al.* 2009). Le complexe est également retrouvé dans l'ouest, dont en Colombie-Britannique, au nord-ouest des États-Unis et en Californie (Grimm *et al.* 2009, McDonnell *et al.* 2011). Finalement, des mentions ont également été faites dans le Midwest américain (Brady et Pearce 2007, Grimm *et al.* 2009). Cependant, des données précises de la répartition du complexe n'ont été récoltées que dans le nord-est de l'Amérique du Nord dans les années 1960 par Chichester et Getz (1969). Ces derniers ont d'ailleurs suggéré que ces limaces avaient le plus grand potentiel de propagation dans cette région, dû à leur capacité d'occuper plusieurs habitats et leur tendance à vivre dans les habitats forestiers naturels. Cette dernière caractéristique a d'ailleurs conduit Chichester et Getz (1969) à suggérer que les limaces du complexe d'*A. subfuscus s. l.* sont celles dont les impacts écologiques pourraient être les plus importants dans une région où l'abondance des espèces indigènes de limaces est généralement faible. En effet, en Amérique du Nord, l'abondance élevée d'*A. subfuscus s. l.* a été notée dans une large gamme d'habitats, autant naturels que perturbés (Chichester et Getz 1969, Beyer et Saari 1977 et 1978 ; Grimm *et al.* 2009).

Ces limaces généralistes au niveau de leur alimentation (Beyer et Saari 1978), se nourrissant de champignons (Mauder et Voitk 2010), lichens (Cameron 2009), plantes (Rathcke 1985), carcasses, fèces et d'autres matières organiques, sont considérées comme des phytoravageurs en agriculture (Banville 1987, Hammond et Byers 2002). Elles sont également connues pour consommer plusieurs plantes indigènes (Rathcke 1985) et ont été associées au broutage d'une espèce de lichen menacé (*Erioderma pedicelatum*) en Nouvelle-Écosse (Cameron 2009). Il a également été démontré en Ontario que ces limaces réduisent la dispersion des graines du gingembre sauvage (*Asarum canadense*) par les fourmis en mangeant l'élaïosome (Dunphy, Prior et Frederickson 2016). Finalement, elles sont connues pour consommer des pousses d'arbres dans les forêts de feuillus (Gardescu 2003) et boréale (Côté, Ferron et Gagnon 2005). Mis à part ces quelques cas, leur impact sur les écosystèmes est largement méconnu, et même l'identité des espèces impliquées est inconnue puisque ce qu'on considérerait comme étant une seule espèce en Amérique du Nord dans toutes les études mentionnées, est en fait un complexe d'espèces en Europe.

Le complexe d'*Arion subfuscus s. l.* en Europe

En Europe, la description originale d'*Arion subfuscus* a été basée sur des critères morphologiques externes, principalement au niveau de la coloration de l'espèce (Draparnaud 1805). Cependant, il a été démontré que ces critères pouvaient être variables selon l'alimentation chez certaines espèces du genre *Arion* (Jordaens *et al.* 2001). De plus, aucun spécimen type n'a été préservé (reporté par Garrido *et al.* 1995). Donc cette espèce a longtemps été considérée comme une espèce très variable au niveau de la morphologie de l'appareil génital (Garrido *et al.* 1995), qui est traditionnellement utilisée pour identifier les différentes espèces de limaces

(Kerney et Cameron 2006), ainsi qu'au niveau de son écologie (Chichester et Getz 1969). Dans les années 1990, un topotype a été préservé et l'espèce redécrite, cette fois-ci en se basant sur des caractères de l'appareil génital et du spermatophore (Garrido *et al.* 1995). Ensuite, plusieurs espèces dans ce complexe ont pu être décrites ou confirmées en se basant sur des caractères morphologiques (Garrido *et al.* 1995) et, plus récemment, grâce à des techniques moléculaires (Pinceel *et al.* 2004, 2005a, 2005b, Jordaens *et al.* 2010).

Dans le nord-ouest de l'Europe, le complexe d'*A. subfuscus s. l.* a été caractérisé et deux espèces différentes y ont été trouvées, *A. subfuscus s. s.* et *A. fuscus* (Pinceel *et al.* 2004). Ces deux espèces ont été identifiées sur la base de leurs différences au niveau de la morphologie des gonades, des allozymes spécifiques à chacune et de l'ADN mitochondrial (16S rDNA) (Pinceel *et al.* 2004). Chez *A. fuscus* deux lignées mitochondriales allopatriques divergentes de 3,3% ont été trouvées pour les gènes 16S rDNA et COI combinés (Pinceel *et al.* 2005a). Chez *A. subfuscus s. s.*, ce sont cinq lignées mitochondriales divergentes de 7 à 21 % pour le 16S rDNA qui ont été trouvées (Pinceel *et al.* 2005b). Ces lignées ont été appelées S1 à S5. Ces lignées se sont avérées avoir une répartition géographique allopatrique sauf pour les lignées S1 et S2 pour lesquelles les aires de répartition se chevauchent partiellement. Toutes les lignées mentionnées ne sont identifiables que par des techniques moléculaires.

Les membres du complexe d'*Arion subfuscus s. l.* en Amérique du Nord

Ce n'est qu'en 2005 que la première caractérisation de la diversité taxonomique a été réalisée en Amérique du Nord (Pinceel *et al.* 2005c). Un total de 219 spécimens de 12 localités a été échantillonné dans le nord-est des États-Unis. Tous les individus ont été identifiés comme

faisant partie d'une seule lignée, S1, de l'espèce *A. subfuscus s. s.* et seulement deux haplotypes mitochondriaux y ont été trouvés, dont un qui n'a pas été retrouvé en Europe, mais qui diffère seulement d'une mutation d'un haplotype européen. Pinceel *et al.* (2005c) ont donc conclu à un effet fondateur important, puisque qu'une faible diversité génétique a été trouvée. En effet, une perte de 96 % d'haplotypes mitochondriaux pour le gène 16S rDNA, de 46 % des allèles d'allozymes, et de 67 % des allèles du gène nucléaire ITS1 par rapport à ce qui a été trouvé en Europe a été observé (Pinceel *et al.* 2005c). En Californie, où les premières mentions datent de 2005, sur 12 spécimens, un seul haplotype mitochondrial, identique à l'haplotype commun du nord-est des États-Unis a été trouvé (McDonnell *et al.* 2011). Cependant, seule une petite portion de l'ensemble de l'aire de répartition d'*A. subfuscus s. l.* a été échantillonnée en Amérique du Nord. Il serait possible, qu'une partie de la diversité taxonomique n'ait pas été échantillonnée. D'ailleurs, dans un projet de code à barres d'ADN ayant pour but d'identifier les espèces d'*Arion* présentes aux États-Unis, *A. fuscus* et la lignée S2 d'*A. subfuscus s. s.* ont été identifiées (Barr *et al.* 2009). Cependant, aucune information n'est fournie quant à l'endroit où ces spécimens ont été récoltés au États-Unis et à l'identité des haplotypes rencontrés.

Aire d'échantillonnage

Le Québec est une région d'un intérêt particulier pour l'étude du complexe d'*A. subfuscus s. l.* En effet, même si le complexe était très commun dans une bonne partie du nord-est de l'Amérique du Nord dans les années 1960, au Québec, il n'avait été retrouvé que dans quelques régions isolées (Chichester et Getz 1969), ce malgré des points d'échantillonnage s'étendant de l'extrême sud du Québec jusque sur la Côte-Nord. Il s'agit donc d'une région pour laquelle des données historiques sont disponibles, mais également, d'une région qui permettra de détecter

sans ambiguïté si une expansion de la répartition du complexe s'est produite depuis les 50 dernières années. De plus, le nord-est des États-Unis représente un des rares endroits en Amérique du Nord pour lesquels la diversité mitochondriale est connue (Pinceel *et al.* 2005c). Il sera donc possible de comparer la diversité mitochondriale trouvée dans les deux endroits.

Objectifs

Ce projet a pour objectif de déterminer la répartition récente, la diversité taxonomique et l'origine des membres du complexe d'*A. subfuscus s. l.* au Québec en se basant sur leur identité mitochondriale. En plus de fournir de nouvelles informations sur le complexe d'*A. subfuscus s. l.* en Amérique du Nord, les contributions de ce projet seront, dans un premier lieu, de voir à quel point des organismes avec des capacités actives de dispersions très limitées peuvent étendre leur aire de répartition, puis dans un second lieu, de constater si des contextes historiques humains différents peuvent réellement mener à des diversités différentes dues à des introductions différentes. Si les membres du complexe se dispersent principalement de façon active, il est attendu que l'expansion de la répartition sera très modérée et chacun des haplotypes introduits sera retrouvé de façon continue autour des points d'introduction. Si au contraire, ces limaces sont dispersées de façon passive, une augmentation de la répartition avec les même haplotypes mitochondriaux trouvés sur des sites distants les uns des autres est attendue. Finalement, malgré leur proximité, le Québec et le nord-est des États-Unis ont des histoires de colonisation humaine et d'échanges commerciaux avec l'Europe qui sont fort différents. De ce fait, les chances que des événements d'introduction différents aient eu lieu aux deux endroits sont plus élevés. Une diversité mitochondriale différente, d'origines différentes, aurait donc pu être introduite aux deux endroits. De plus, si un patron de dispersion passive est constaté, il est

attendu que si la dispersion est accomplie par le transport via les activités humaines, la probabilité de dispersion sera plus grande à l'intérieur d'une région qu'entre les régions dû à un contrôle plus strict aux douanes. Des diversités mitochondriales différentes seraient donc présentes de chaque côté de la frontière, ce qui ne serait pas le cas pour une dispersion passive via des moyens dits naturels.

**Chapitre 1: A discrete Invasion: Distribution, Origins and
Expansion of the European slug complex
Arion subfuscus s. l. in Quebec**

Authors : Érik L'Heureux, François-Joseph Lapointe and Bernard Angers

Author contributions:

This study was elaborated by É. L'H. with the support and suggestions of B. A. and F.-J. L. Sampling was performed by É. L'H. and several collaborators throughout Quebec. Laboratory and statistical analyses were performed by É. L'H. Finally, the article was written by É. L'H. and was supervised by B. A.

Introduction

Numerous studies report the impacts that exotic species have on their novel ecosystems. Introduced species will develop new biotic and abiotic interactions in their novel environments and, in doing so, will change ecosystem dynamics (e.g. Bohlen *et al.* 2004, Meirmans *et al.* 2010, Wood *et al.* 2015). To accurately assess the magnitude and nature of consequences on their new habitats, a proper identification of exotic species is required. As such, species complexes pose a particularly challenging problem, since several species, with potentially distinct ecological characteristics, are often treated as a single taxon (Bickford *et al.* 2007, Rowson *et al.* 2014). The distribution of exotic species is strongly related to human activities (Taylor & Irwin 2004), so that regions with different histories of introduction can harbor different lineages. Therefore, data on species complexes from a given area cannot be generalized to other regions in absence of proper identification. When, in addition, introduced taxa have a restricted capacity of active dispersion, it is expected that the expansion of their distribution following their introduction will either, be continuous and very slow, or, follow a stepping-stone pattern accomplished by passive means such as transportation via human activities (Suarez, Holway & Case 2001). Therefore, the distribution of exotic slow active dispersers is even more related to anthropogenic activities.

Examples of organisms with slow means of locomotion are terrestrial slugs. In North America, a third of the exotic terrestrial gastropods are slugs (Nekola 2014). Amongst them, the genus *Arion* is the most speciose (Nekola 2014) and represents at least nine species introduced on the continent (Barr *et al.* 2009, Grimm *et al.* 2009). Some *Arion* species are ancient introductions (Binney 1842, Pilsbry 1948), with erroneous identifications found in North American literature (determined by Pilsbry 1948). Furthermore, several species are organised in species complexes

only identifiable by dissections or molecular analyses (Quinteiro *et al.* 2005, Rowson *et al.* 2014). Due to their difficult identification and the fact that they are often viewed as non-charismatic animals, this group did not receive the attention given to other exotic taxa (Nekola 2009, Regnier, Fontaine & Bouchet 2009) such as Lepidoptera (e.g. Liebhold, Halverson & Elmes 1992, Hight *et al.* 2002), birds (e.g. Wehtje 2003) or even aquatic molluscs such as the zebra mussel (e.g. Johnson & Carlton 1996). Surveys are thus scarce, distribution expansions not followed and species within complexes often pooled together in North American studies.

The *Arion subfuscus s. l.* species complex is composed of slugs native to Europe, that are amongst the most commonly encountered slugs in North America, particularly in the northeast (Chichester & Getz 1969). The first record of the *A. subfuscus s. l.* species complex in North America was attributed to Binney (1842) in the vicinity of Boston (Chichester & Getz 1969). However, the specimen description based on colorations and size does not only fit the *A. subfuscus s. l.* species complex characteristics, and could be attributed to large specimens of other species complexes such as the *A. fasciatus* species complex. Even if those slugs are found across North America (Pilsbry 1948, Chichester & Getz 1969, Gleich & Gilbert 1976, Brady & Pearce 2007, Grimm *et al.* 2009, McDonnell *et al.* 2011), fine distribution data were only acquired for northeastern North America by Chichester and Getz (1969) in the 1960s. They considered that this species complex had the greatest dispersal potential in northern North America, due to both its ability to occupy multiple habitats and its propensity to inhabit natural forested habitats. This latter characteristic led to the idea that this European species complex might be the slugs with the most important ecological impacts in a region where native slug abundance is naturally low. Indeed, in North America, its high abundance has been noted in a large array of both highly anthropogenic to natural undisturbed habitats (Chichester & Getz

1969, Beyer & Saari 1977, 1978, Grimm *et al.* 2009) where potential impacts vary (Rathcke 1985, Banville 1987, Hammond & Byers 2002, Gardescu 2003, Côté, Ferron & Gagnon 2005, Cameron 2009, Dunphy, Prior & Frederickson 2016.). Apart from a few cases, its impact on natural ecosystems remains largely unknown, and the identity of the species involved is unknown.

In Europe, this species complex has long been treated as a single very variable species in terms of coloration and gonad morphologies (Garrido *et al.* 1995, Kerney & Cameron 2006). No type specimen was originally preserved and original descriptions were only based on external characters (Draparnaud 1805), while coloration is known to be variable in some *Arion* species depending on food consumed (Jordaens *et al.* 2001). In the 1990s, a topotype was preserved and the species re-described based on genital and spermatophore morphologies, and new species were confirmed and described (Garrido *et al.* 1995). Recently, this species complex was investigated in Europe where specimens were collected and analysed using both molecular means and gonad morphologies (Pinceel *et al.* 2004, 2005a, 2005b, Jordaens *et al.* 2010). Pinceel *et al.* (2004) in northwestern Europe found at least two distinct species based on different gonad morphologies, allozyme loci specific to each and mitochondrial DNA (16s rDNA): *A. subfuscus s. s.* and *A. fuscus*. *Arion fuscus* comprised two allopatric mitochondrial lineages divergent of 3.3% (16s rDNA and COI combined) (Pinceel *et al.* 2005a), while five mitochondrial lineages, called S1 through S5, divergent of 7 to 21% (16s rDNA) were found for *A. subfuscus s. s.* (Pinceel *et al.* 2005b). All those lineages are only identifiable using molecular techniques (Pinceel *et al.* 2004, 2005a, 2005b, Jordaens *et al.* 2006).

Very few studies concerning the taxonomic diversity were conducted in North America, so the identity of the members of the complex is only known within a small part of the North American

range. In New England (Pinceel *et al.* 2005c) and California (McDonnell *et al.* 2011), only a single lineage (S1) of *A. subfuscus s. s.* was detected, represented by two haplotypes, one of them being found in only one site in New England. Specimens of the lineage S2 and *A. fuscus* were also recorded in North America, but no information on geographic localisation was given (Barr *et al.* 2009).

This study aims at determining the current distribution, taxonomic identity and the origins of the members of the *A. subfuscus s. l.* complex in Quebec (Canada) based on mitochondrial DNA. In addition to providing new information on the *A. subfuscus s. l.* species complex in North America, this paper aims to assess how a species with extremely limited active dispersal capacities can manage to spread via passive means and how differences in human historical background can lead to different introduced taxonomic diversities. Quebec represents a relevant study region since exotic slug species were surveyed in the 1960s (Chichester & Getz 1969). Past distribution of the species complex thus is well-known and can be compared to current distribution. Furthermore, at the time, although abundant in the northeast of the USA, the *A. subfuscus s. l.* species complex was confined to a few localised areas in Quebec, hence distribution expansion, if occurred, would be unambiguously detected. In addition, while Quebec is geographically close to locations where specimens in New England were originally identified (Pinceel *et al.* 2005c), both regions have a history of human colonisation and economic trade with Europe that are completely different, so a different taxonomic diversity might have been introduced.

Methodology

Specimens of the *A. subfuscus s. l.* species complex were sampled at 68 sites in total throughout southern Quebec and one site in Nova Scotia (Figure 1, Table 2). Sampling was performed mostly in 2014 and 2015. Previously collected specimens were also used to increase the number of sites; those specimens were collected from 2009 to 2013 (Table 2). Individuals were visually identified as *A. subfuscus s. l.* according to external morphological characters as detailed in Chichester & Getz (1973), Kerney & Cameron (2006), and Grimm *et al.* (2009). Specimens were mostly captured by handpicking, but cardboard panels baited or not with cabbage were also set on some sites to attract slugs. To maximise the number of species/lineages encountered, an attempt was made to sample in various habitats, from natural to disturbed, and specimens with various colorations and sizes were collected wherever possible. Beside the author, several specimen collectors contributed to the sampling effort. Since several collectors are implicated and methods of collection not standard, data presented in Table 2 only show presences of the members of *A. subfuscus s. l.* species complex in sites, so that numbers of specimens per site do not correspond to slug abundance on those sites. Also, given that no systematic sampling was performed, sites where no specimen were collected are not included. A sampling was conducted in southeastern Quebec (circled region in Figure 1) represented by 28 sites in a radius less than 20 km to assess the effect of geographical scale. This region was more intensively sampled in order to detect whether large scale sampling and local finer sampling lead to similar tendencies in terms of species/lineages distribution patterns and abundances. This region was chosen because it is located at the southernmost tip of Quebec, so that expansion of slug distribution with haplotypes from the USA would be more likely to be detected if it occurred. The finer local scale sampling, by having a greater number of sites close one to each other, would allow

to assess the co-occurrence of species or disjoint distribution of species or haplotypes that could potentially be erroneously observed at a larger scale. Specimens were stored at -20°C or in 95% ethanol until molecular analyses were performed.

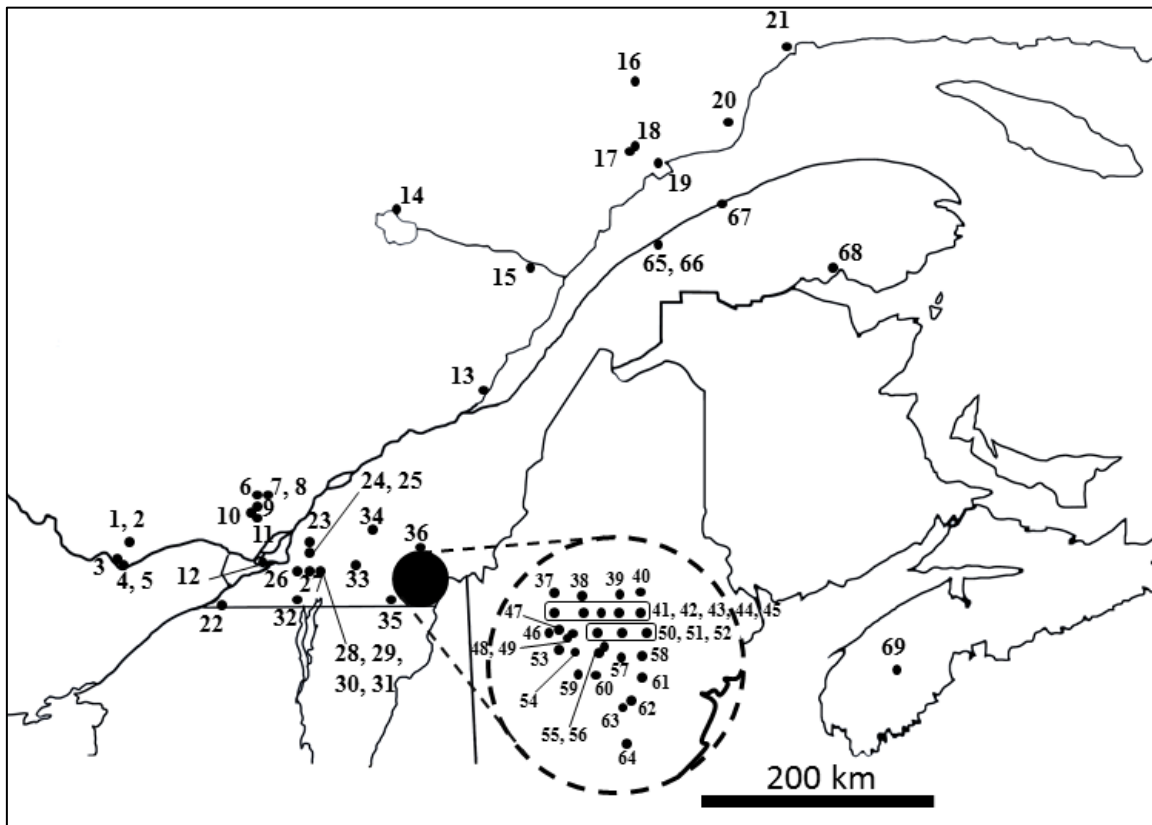


Figure 1. Map of sampling sites. Sampling sites are numbered (1 to 69). Note the circled region where a higher density of sites was sampled (sites 37 to 64) in a less than 20 km radius.

A piece of foot tissue was dissected from preserved specimens for DNA extractions. Whole individual or the posterior part of the slug was used for smaller individuals. Total DNA was extracted by proteinase K digestion followed by phenol-chloroform purification and ethanol precipitation (Sambrook, Fritsch & Maniatis 1989).

Individuals of the *A. subfuscus* s. l. complex were further characterized at the mitochondrial level using a segment of the 16S rDNA gene. A 256 bp segment was amplified using the primers 5'-AGACGAGAAGACCCTYAGAG and 5'-GGTYTGAACTCAGATCAGATCAYGT

modified from Pinceel *et al.* (2004). PCR amplifications were carried out in a volume of 12.5 μ L containing 2.5 nmol/L of each dNTP, 0.3 μ mol/L of each primer, 0.2 units of Taq polymerase, 1.25 μ L of 10x Taq polymerase buffer (Feldan®) and approximately 20 ng of DNA. Amplifications were carried out using the following conditions: one cycle of denaturation at 92°C for 30 sec, and 45 cycles of denaturation at 92°C for 30 sec, annealing at 50°C for 15 sec, and extension at 68°C for 30 sec, with a final extension at 68°C for 2 min. The polymorphism of 16S rDNA gene was then screened using the single strand conformation polymorphism (SSCP, Orita *et al.* 1989). The locus was electrophoresed on a 6% non-denaturing polyacrylamide gel (acrylamide/bisacrylamide 37.5:1) for 13 h at 15 W at 4°C. SSCP gels were revealed using the procedure proposed by Benbouza *et al.* (2006). Each different SSCP conformation for the 256 bp segment was sequenced. For some of the conformations, specimens from multiple locations were sequenced in order to assess reliability of SSCP in discriminating different haplotypes. The purified segments were sequenced with CEQ Quick Start Master Mix kit (Beckman Coulter, Fullerton) according to the supplier protocol using a CEQ2000 genetic analyser (Beckman Coulter, Fullerton).

Because a 256 bp segment may correspond to different haplotypes for the complete 16S rDNA, a 469 bp segment of this gene was then sequenced for some haplotypes using 5'-CGCCTGTTTAWCAAAAACAT and 5'-GGTYTGAACTCAGATCAGATCAYGT primers modified from Pinceel *et al.* (2004). Sequences were aligned using CLUSTAL W (Thompson, Higgins & Gibson 1994). Sequences obtained were blasted on Genbank (consulted on July 20th, 2016) to determine their identity and their distribution of origin. Since mitochondrial lineages are usually allopatric and haplotypes are mostly region specific (see

Pinceel *et al.* 2004, 2005a, 2005b), origins were inferred. The nomenclature used by Pinceel *et al.* (2004, 2005a, 2005b, 2005c) was used to refer at the different haplotypes and lineages.

Co-occurrence among species was evaluated using the C-score index (Stone and Roberts 1990) for all sites that contained five or more individuals. To test the significance of the C-score index, the presence/absence of species across sites was permuted. Species were randomly allocated across sites 9999 times. The number of sites where a species was found was kept constant across permutation sets, but the number of species at each site was allowed to vary. For every permuted set, the C-score was calculated and compared with the observed value. The threshold of significance was established at 0.05. Analyses were performed using the R package EcoSimR (Gotelli, Hart & Ellison 2015).

The 28 sites, comprised in the 20-km radius (local scale), were analysed separately from the 41 other sites (large scale). Both groups were compared for the proportions of sites in which species/lineages were found using the Fisher Exact Probability Test (Fisher 1925). The C-score index was also calculated for both the sites at local scale and large scale separately.

Results

Genetic identification of specimens

Specimens of the *A. subfuscus s. l.* species complex were found in all regions sampled. A total of 526 specimens from 69 sampling sites were genetically identified. Number of specimens analysed per site as well as their genetic identities are summarised in Table 1. Only eight different haplotypes were detected according to SSCP conformations. The 256 bp sequence revealed the presence of *A. fuscus* as well as two highly divergent lineages, S1 and S2, of *A. subfuscus s. s.*

Three haplotypes have a sequence identical to the one of haplotypes A, C and F-32 belonging to *A. fuscus* (as named by Pinceel 2004, 2005a). An additional haplotype, differing by a single nucleotide from haplotype A, did not correspond to any sequence on Genbank. This haplotype, represented by only one specimen, was designated as haplotype Johnville hereafter, according to the town name where it was found. These haplotypes were closely related to each other; all of them diverge by a single mutation from haplotype A.

The four remaining haplotypes matched with haplotypes S1-03 and S1-10 / I of the lineage S1 and haplotypes S2-02 / L and S2-07 / Q of the lineage S2 (as named by Pinceel 2004, 2005b, 2005c) of *A. subfuscus s. s.* Haplotypes of the lineage S1 diverge by seven mutations while those of the lineage S2 diverge by a single mutation. The Genbank accession numbers of the sequences that perfectly matched with the haplotypes found are included in Table 1.

Table 1. Sequences from Genbank corresponding to the haplotypes detected in Quebec and Nova Scotia.

Haplotype	Genbank accession numbers
A	AJ518037, AJ518037, EU541952, KF894095, DQ465817
C	AJ518039
F-32	AJ786743
S1-03	AY861459, GU214712, EU541950, KF356235
S1-10 / I	AY860673, AJ518045, KF894098, EU541949
S2-02 / L	AY860699, AJ518048
S2-07 / Q	AY860687, AJ518053, KF894126

No additional variants were detected by sequencing several individuals from distinct locations of a given SSCP conformation. The 256 bp sequence was obtained for five haplotypes A, one F-32, one C, one Johnville, one S1-03, one S1-10, two S2-02 and three S2-07 individuals. Some

of those individuals were sequenced for the 469 bp, i.e. four haplotype A, one F-32, one Johnville, one S1-10, two S2-02 and two S2-07. The 256 bp segment corresponds to several haplotypes for the 469 bp segment only for haplotypes A, S1-10, S2-02 and S2-07. Within a mitochondrial lineage, no additional mutations among haplotypes were detected in the additional 213 bp of the 469 bp segment (observed in specimens sequenced and Genbank sequences of the haplotypes collected).

Table 2. Geographic coordinates (decimal degrees) of the sampling sites and numbers of specimens of each haplotype collected.

Site	Year of collection	Latitude (DD N)	Longitude (DD W)	<i>Arion fuscus</i>				<i>Arion subfuscus</i>		<i>Arion subfuscus</i> S2	
				A	F-32	C	Johnville	S1		S2-02/L	S2-07/Q
								S1-03	S1-10/I		
1	2015	45.66932	-75.81187	7	-	4	-	-	-	-	-
2	2015	45.64695	-75.79209	11	-	-	-	-	-	-	-
3	2014	45.50665	-75.91418	-	-	10	-	-	-	-	-
4	2014	45.48237	-75.85093	1	-	-	-	-	-	-	-
5	2014	45.48806	-75.81799	3	-	7	-	-	-	-	-
6	2014	46.08620	-73.95212	2	-	-	-	-	-	-	-
7	2015	46.08668	-73.87852	8	-	1	-	-	-	-	-
8	2015	46.09291	-73.87149	11	-	-	-	-	-	-	-
9	2015	45.98907	-74.00576	2	-	-	-	-	-	-	-
10	2015	45.93388	-74.10188	8	-	-	-	-	-	-	-
11	2014	45.91348	-74.03611	3	-	-	-	-	-	-	-
12	2014	45.43320	-73.94512	1	-	-	-	-	-	-	-
13	2013/14	47.07658	-70.78364	-	16	-	-	-	-	-	-
14	2014	48.76702	-72.04807	10	-	-	-	-	-	-	-
15	2015	48.24254	-70.24483	5	-	-	-	-	-	-	-

16	2011	49.92264	-68.74539	-	5	-	-	-	-	-	-
17	2011	49.30647	-68.80828	-	2	-	-	-	-	-	-
18	2011	49.32631	-68.74994	-	2	-	-	-	-	-	-
19	2007	49.21172	-68.42872	-	1	-	-	-	-	-	-
20	2014	49.53839	-67.48871	10	-	-	-	-	-	-	-
21	2014	50.22046	-66.66375	-	-	-	-	-	11	-	-
22	2014	45.02144	-74.48789	11	-	-	-	-	-	-	-
23	2015	45.64232	-73.25705	2	-	-	-	-	-	-	-
24	2014	45.54770	-73.34153	10	-	-	-	-	-	-	-
25	2014	45.55675	-73.30347	-	16	-	-	-	-	-	-
26	2015	45.36507	-73.39167	-	-	-	-	-	-	10	-
27	2015	45.36833	-73.30040	8	-	-	-	-	-	-	-
28	2015	45.36810	-73.20890	19	11	-	-	-	-	-	-
29	2014/15	45.37230	-73.20600	12	-	-	-	-	-	-	-
30	2015	45.37105	-73.20192	11	-	-	-	-	-	-	-
31	2015	45.35613	-73.14211	-	1	-	-	-	-	-	-
32	2015	45.07017	-73.42028	1	-	-	-	-	-	-	-
33	2014	45.42900	-72.62901	-	7	-	-	-	-	-	-
34	2014	45.74490	-72.41644	6	1	-	-	-	-	-	-
35	2015	45.09597	-72.18347	1	-	-	-	-	-	-	-
36	2013	45.61789	-71.72325	4	-	-	-	-	-	-	-
37	2014	45.45564	-71.89464	10	-	-	-	-	-	-	-
38	2014	45.44688	-71.81490	10	-	-	-	-	-	-	-
39	2014	45.45296	-71.69117	10	-	-	-	-	-	-	-
40	2014	45.45675	-71.63449	10	-	-	-	-	-	-	-
41	2013	45.41375	-71.88964	4	-	-	-	-	-	-	-
42	2014	45.40915	-71.81266	10	-	-	-	-	-	-	-

43	2014	45.41258	-71.74332	-	-	-	-	-	-	-	1
44	2014	45.41402	-71.69702	10	-	-	-	-	-	-	-
45	2014	45.41411	-71.63198	-	-	-	-	-	-	6	21
46	2013	45.37866	-71.91030	1	-	-	-	-	-	-	-
47	2014	45.37398	-71.88883	10	-	-	-	-	-	-	-
48	2010	45.36196	-71.84985	-	-	-	-	2	4	-	-
49	2014	45.36850	-71.83381	3	-	-	-	-	-	-	-
50	2014	45.36770	-71.76443	10	-	-	-	-	-	-	-
51	2014	45.37049	-71.68268	10	-	-	-	-	-	-	-
52	2013/14	45.36775	-71.60811	11	-	-	-	-	-	-	-
53	2014	45.33125	-71.88476	10	-	-	-	-	-	-	-
54	2014	45.32876	-71.83054	10	-	-	-	-	-	-	-
55	2014	45.32638	-71.75928	8	-	-	-	-	-	-	-
56	2013	45.33987	-71.74373	3	-	-	1	-	-	-	-
57	2014	45.32186	-71.68902	10	-	-	-	-	-	-	-
58	2014	45.32108	-71.62826	10	-	-	-	-	-	-	-
59	2014	45.28244	-71.82674	10	-	-	-	-	-	-	-
60	2014	45.27775	-71.76977	8	-	-	-	-	-	-	-
61	2014	45.27184	-71.62581	2	-	-	-	-	-	-	-
62	2013	45.22184	-71.65712	1	-	-	-	-	-	-	-
63	2013	45.20634	-71.68301	4	-	-	-	-	-	-	-
64	2014	45.12862	-71.67242	1	-	-	-	-	-	-	-
65	2014	48.46004	-68.48602	1	-	-	-	-	-	-	-
66	2014	48.49943	-68.47304	5	-	-	-	-	-	-	-
67	2014	48.81169	-67.59574	-	-	-	-	-	7	-	2
68	2014	48.22139	-66.05250	-	5	-	-	-	-	-	-
69	2009	44.42442	-65.10038	8	-	-	-	-	-	-	5

Geographical distribution

Arion fuscus was by far the most widely distributed species (Figure 2), found in 63 out of 69 sites (91.3 %). This species was collected in all regions sampled, from southern Quebec up to the 50th parallel north. More specifically, haplotype A was widespread and found on 53 sites. Haplotype F-32 was found on 11 sites, but was also detected in most of the regions surveyed. Haplotype C was restricted to four sites located in the western part of the sampling area and the Johnville haplotype was detected on a single site in southern Quebec.

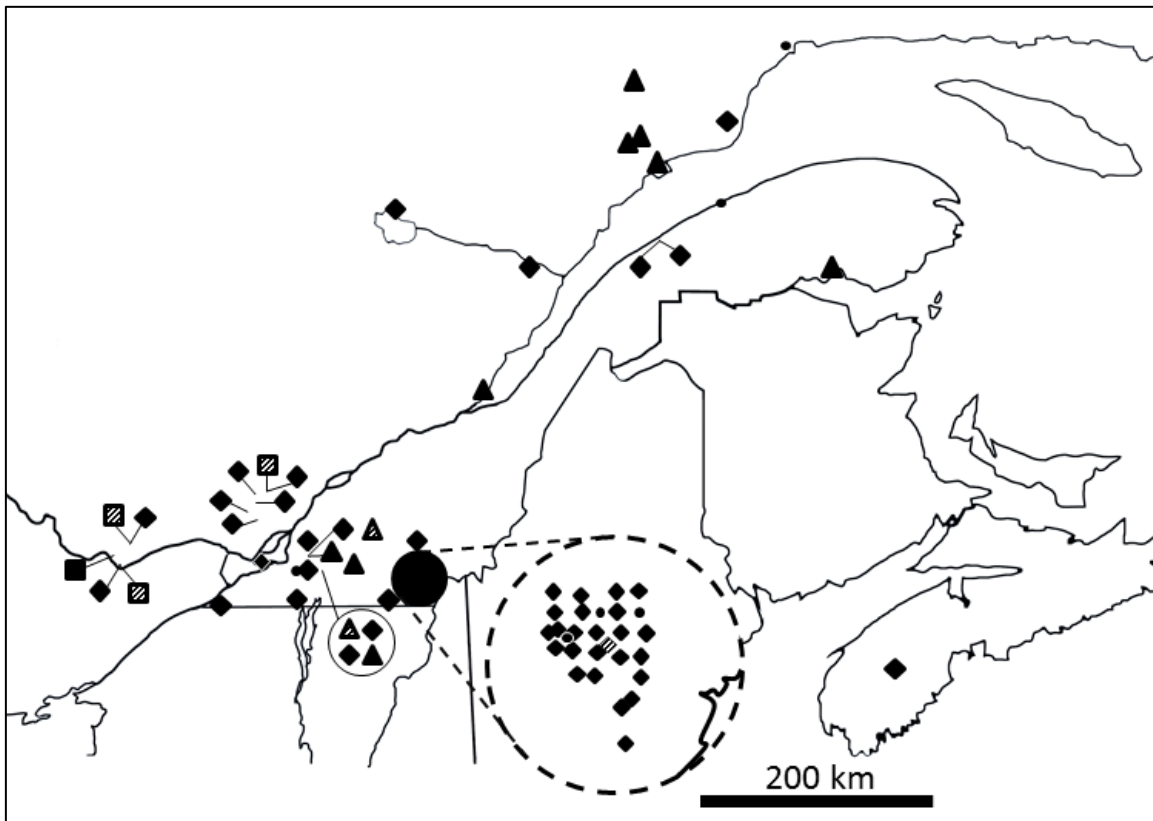


Figure 2. Presence of *Arion fuscus* in sampled sites. Sites where *Arion fuscus* was detected: haplotypes A (◆), F-32 (▲), C (■), both A and F-32 (▲), both A and C (▣), as well as both A and Johnville (⊗). Sites where *A. fuscus* was not detected, but other species of the complex are also indicated (●).

On the other hand, the mitochondrial lineages S1 and S2 of *A. subfuscus s. s.* were only detected in 3 (4.3%) and 5 sites (7.2%) respectively (Figure 3). In spite of their low abundance, specimens

of haplotype S1-10 and S2-07 were found on distant sites separated by up to 500 km in Quebec without intermediate populations detected. The haplotype S1-10 was collected in southern Quebec, in eastern Quebec and on the northernmost sampling site on the north shore of St. Lawrence River. The haplotype S2-07 was collected in southern Quebec, as well as in eastern Quebec and in Nova Scotia. Other haplotypes of *A. subfuscus s. s.* are restricted to a single or a few sites in southern Quebec near the Canada/USA border.

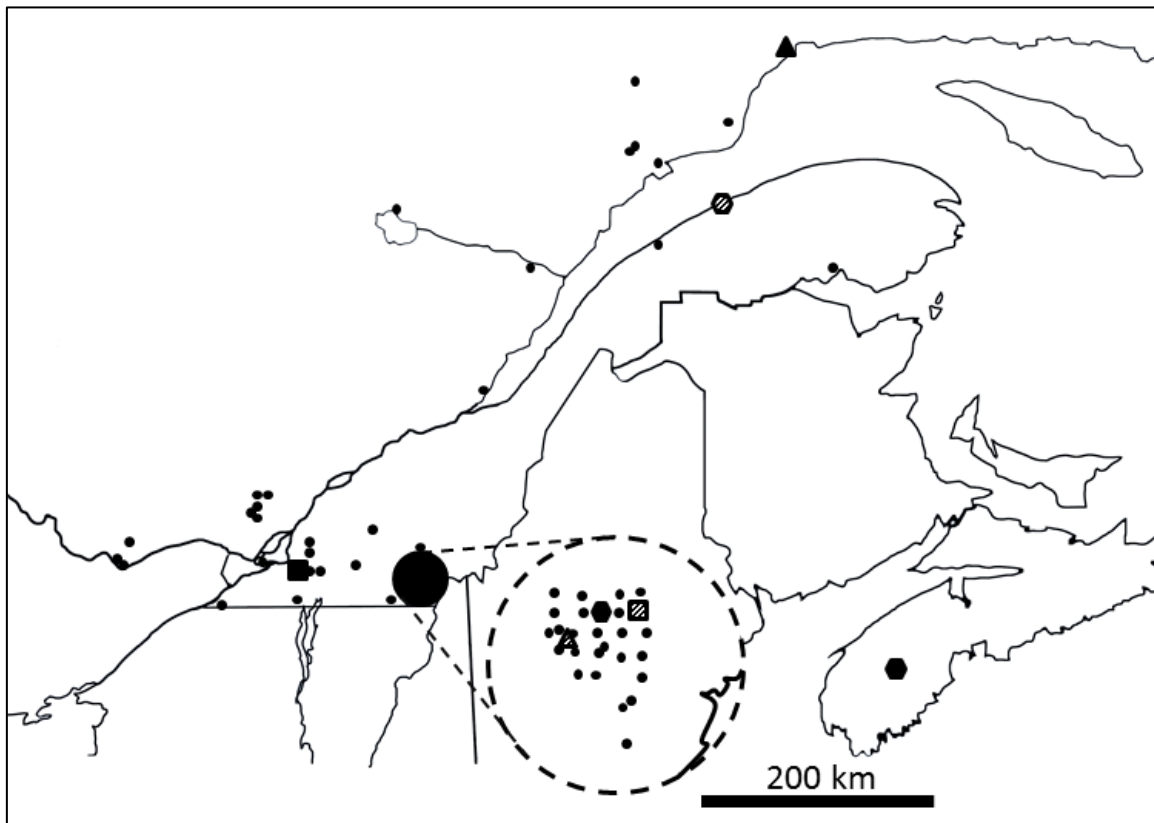


Figure 3. Presence of *Arion subfuscus s. s.* in sampled sites. Sites where *Arion subfuscus s. s.* was detected: haplotypes S1-10 (▲), both S1-03 and S1-10 (▲), S2-02 (■), S2-07 (●), both S2-02 and S2-07 (▨), as well as both S2-07 and S1-10 (◐). Sites where *A. subfuscus s. s.* was not detected, but other species of the complex were, are also indicated (●).

Results of the sampling performed at a small geographical scale revealed the same species/lineages abundances than the one observed from the survey throughout Quebec. On the 28 sites included in the 20-km radius sampling, *A. fuscus* was detected in 25 sites (89.3%), the

lineage S1 in 1 site (3.6%) and the lineage S2 in 2 sites (7.1%). Those proportions were not significantly different (Fisher Exact Probability Test $P = 1.0$) from those found in the other 41 sites sampled throughout Quebec and Nova Scotia, where *A. fuscus* was found in 38 sites (92.7%), the lineage S1 in 2 sites (4.9%) and the lineage S2 in 3 sites (7.3%).

Spatial organisation

Results of this survey revealed that *A. fuscus* and *A. subfuscus s. s.* usually do not coexist at the same sites. Both species were found in allopatry in the 68 sites from Quebec; they were only found in sympatry in the site in Nova Scotia. Therefore, using the sites where five specimens or more were captured (46 sites, Table 2), the C-score index calculated for those sites was high 0.81 and highly significant (p-value: 0.0001). Similar results were obtained by calculating the C-score index for the local scale sampling (19 sites, Table 1) separately from the large scale sampling (27 sites, Table 1). The C-score indexes are 1 (p-value: 0.005) and 0.72 (p-value: 0.0008) respectively.

Discussion

Origins

The objective of this study was to assess the current distribution, taxonomic identity and the origins of the members of the *A. subfuscus s. l.* species complex in Quebec using mitochondrial DNA analysis. European distribution was assessed by combining distribution information given by Pinceel *et al.* (2004, 2005a, 2005b, 2005c) and specimen locations mentioned on Genbank. Our results revealed that the sequences of the haplotypes found in Quebec and Nova Scotia perfectly match those of European origins. In addition, a very low mitochondrial diversity is present in Quebec when compared to Europe where 49 different haplotypes have been reported for *A. fuscus* (Pinceel *et al.* 2005a) and 51 haplotypes of five mitochondrial lineages for *A. subfuscus s. s.* (Pinceel *et al.* 2005b). Previous authors suggested that the *A. subfuscus s. l.* species complex might be indigenous to North America because it was found on uninhabited islands off shore of Newfoundland (Brooks & Brooks 1940) and has penetrated in natural habitats (Grimm *et al.* 2009); our results allow ruling out this scenario. If the complex was indigenous, it would have been expected that the haplotypes present in North America would be divergent from those of European origins. However, all haplotypes, but S1-03, were from European origins.

The haplotypes belonging to *A. fuscus* found in Quebec are mainly from Central and Northern Europe, with haplotypes restricted to each region. Therefore, at least two introduction events occurred to constitute the Quebec mitochondrial diversity of *A. fuscus*. Haplotype A was detected in Belgium, Denmark, Northern Germany, the Netherlands, southern Norway, southern Sweden, as well as eastern Lithuania. It was also reported from the United Kingdom while the native status of *A. fuscus* is uncertain due to the low number of locations where its presence was

detected (Rowson *et al.* 2014b). Therefore, mitochondrial data cannot discriminate whether this haplotype was introduced in North America from the European mainland or the British Isles. Haplotype C had a more restricted range and was detected from Northern Denmark and Southern Norway. Haplotype F-32 was reported from southwestern Germany only. The Johnville haplotype could be an undetected haplotype from Europe; however, since only one specimen of that haplotype was found in the intensively sampled 20 km radius area, the most parsimonious explanation would be that a mutation occurred *de novo*.

The haplotypes of *A. subfuscus s. s.* originate from Western Europe. Here, it is not possible to assess whether haplotypes were introduced in Quebec from the European mainland or the British Isles for haplotypes found in both regions. Haplotype S1-10 was detected in the United Kingdom and northern Belgium. Haplotype S2-02 was found in Belgium and northern France. Finally, the haplotype S2-07 was largely distributed in Europe, and present in northern France, southern Ireland, the United Kingdom, and the Netherlands. Actually, the haplotype S1-03 was the only haplotype specific to North America, but is only distant from one or two mutations from haplotypes found in northern France and Belgium (Pinceel *et al.* 2005c). The sequence of haplotype S1-03 obtained in this study perfectly matched sequences of specimens found in USA only. In summary, with the presence of haplotypes with non-overlapping distribution in Europe, i.e. haplotypes C and F-32 belonging to *A. fuscus*, as well as *A. subfuscus s. s.*, at least three introduction events from distinct European regions occurred to explain the diversity detected in Quebec. In addition, the haplotype S1-03 originated from the USA, even if its distribution in Quebec is restricted to one site only.

Distribution expansion of the *Arion subfuscus s. l.* complex

In this study, specimens of the *A. subfuscus s. l.* species complex were found in all regions sampled, showing a species complex widely distributed and well established up to relatively northern latitudes. These results contrast with the distribution of the complex previously determined approximately 50 years ago by Chichester and Getz (1969) (Appendix I). Indeed, in 1965-1966, despite an extensive sampling throughout southern Quebec up to 50th parallel on the North Shore of the St. Lawrence River, the complex was extremely localised as individuals have been only found in the west, the east and extreme southern Quebec. In fact, Chichester and Getz (1969) only detected the presence of the *A. subfuscus s. l.* species complex on 21 sites over the 130 sampled sites in Quebec (number of sampled sites was estimated by counting the number of sites the map). This finding is particularly surprising since Chichester and Getz (1969) sampled most of the areas where specimens were collected in this study and did not detect the presence of the *A. subfuscus s. l.* complex. Furthermore, they used a similar sampling method, i.e. active sampling in sites and search under different kinds of debris. The size and the coloration make these species easy to detect in the field. The absences of the *A. subfuscus s. l.* species noted by Chichester and Getz (1969) in most parts of Quebec (while other slugs have been captured) thus suggest actual absences of these slugs 50 years ago.

For example, in 1965, despite a sampling all along the north shore of the St. Lawrence River, the *A. subfuscus s. l.* species complex was only found around the city of Trois-Rivières. However, 50 years later, specimens were collected up to the 50th parallel North on the North Shore of St. Lawrence River, which represent a minimal expansion of the distribution of about 615 km on a straight line (i.e. about 12 km per year). In southern Quebec, a marked expansion

of the distribution was also noted, but much less dramatic due to the fact that in the 1960s, the complex was already common in northeastern USA (Chichester & Getz 1969).

Mitochondrial diversity, distribution and modes of dispersion

Chichester and Getz (1969) did not determine the identity of the isolated populations present in Quebec half a century ago. However, results show that *A. fuscus* is the most widely distributed species in Quebec nowadays, present in all regions sampled. This contrasts with the results obtained in northeastern USA and California where the lineage S1 of *A. subfuscus s. s.* was the only one found and where the haplotype S1-03 was collected on all sites (Pinceel *et al.* 2005c, McDonnell 2011). This haplotype was only detected in a single site in Quebec, near the Canada/USA border. The history of introduction in Quebec seems therefore to be completely different than in the USA, even if both regions are geographically adjacent. Since both regions harbor historical human colonisation and economic trade with Europe that are quite different, the probability of having different introduction events is higher. Several studies reported slugs intercepted on (Godan 1983, Robinson 1999, Barr *et al.* 2009) or introduced via (Poulin 1967) imported goods, especially in plant material. *Arion fuscus* and the lineage S2 of *A. subfuscus s. s.* were also detected in the USA (Barr *et al.* 2009), but precise data on their distribution are presented for the first time in North America. Furthermore, the identity of the haplotypes detected was not mentioned for the specimens found in the USA.

The distribution pattern of *A. subfuscus s. s.* is consistent with the passive dispersal mode of these slugs. Even if, extremely localised, haplotypes S1-10 and S2-07 especially, have a disjointed distribution separated by hundreds of kilometers. Since only 69 sites were sampled, it is possible that sites with those haplotypes have been missed, and the distance between the populations over-evaluated. Nevertheless, the local scale sampling confirm that the distribution

of several haplotypes is really disjointed. Indeed, in this local sampling, haplotypes S1-03 and S1-10 were found in a single site (site #48 on Figure 1) over the 28 sites sampled. Furthermore, the nearest sites (sites #46, 47, 49, 53 and 54 on Figure 1), that were located all around, were only distant from 1.4 to 5.1 km. A similar case occurred with the haplotype S2-02. This distribution shows that instead of being active dispersers from a single or a few centers of introduction, those slugs are most probably dispersed by passive means. It is expected that if human activities are responsible for this passive dispersal, transport of slugs via trade would be more likely to occur within a country than between countries since control and interceptions would limit slug transportation across the borders. This is exactly the pattern that was detected with a haplotypic diversity different in Quebec compared to northeastern USA as determined by Pinceel (2005c). Moreover, McDonnell *et al.* (2011), using mitochondrial data, attributed the origin of the *A. subfuscus s. l.* specimens found in California to northeastern USA, suggesting dispersal via human activities. Chichester and Getz (1969) suggested the importance of transport via plant material for dispersal of northeastern North American slugs. In this case, transport via plant material such as ornamental plants would be extremely doubtful in the case of the northernmost sites. Some of these sites are far away from towns. In that case, transport of trees and machinery of wood industry as well as transports of construction materials from the south are potentially the most obvious explanations for the presence of *A. fuscus* and the lineage S1 of *A. subfuscus s. s.* in the north, but since no observation were reported this will remain speculative until investigations are proceeded. In this study, the northern limit of the distribution was not attained. Natural modes of dispersal such as transport of slugs by birds (Pearce *et al.* 2012) would not explain the different haplotypic diversities recorded from both countries, while large disjointed distribution of the same haplotypes was recorded within countries.

Another particularity in the distribution of these species is that *A. fuscus* and *A. subfuscus s. s.* were found in allopatry, which was emphasised by high and significant C-score indexes at a large and at a local geographical scale. If allopatry at a large scale may be the result of a colonisation in progress (all potential sites are not occupied yet by all the species), the same results among sites separated by a few kilometers only strongly support an effective absence of co-occurrence.

Intraspecific and interspecific aggressions among slugs are known to occur, and can result in spatial exclusions (Rollo & Wellington 1979). Non-identified specimens of the *A. subfuscus s. l.* complex were shown to be one of the most aggressive species (Rollo & Wellington 1979). Even if spatial exclusion could explain the allopatry observed in Quebec, distinct habitats requirements could also be the cause. In Europe, *A. fuscus* was mostly described as a hygrophilous species, while *A. subfuscus s. s.* was mostly restricted to forests (Kappes 2006). Both species also have different densities in certain types of habitat (Kappes & Schilthuizen 2014). Still, both species in Quebec were found in a large range of latitudes, harboring an array of bioclimatic conditions (Ministère des Forêts, de la Faune et des Parcs du Québec 2016).

Conclusion

Several species and mitochondrial lineages of the *A. subfuscus s. l.* complex were introduced in Quebec from distinct European regions. The results obtained show that the invasive status greatly varies between species of the *A. subfuscus s. l.* complex, with *A. fuscus* being the major invader in Quebec. This species severely expanded its distribution in Quebec since the last 50 years and is now common and found throughout all regions sampled. Those results, compared

to the diversity found elsewhere in North America, emphasized the importance of not considering an exotic species complex as a single species, especially when different international economic trade is involved.

Acknowledgements

We would like to thank the numerous specimen collectors who were essential in this study, as well as the landowners from who we obtained permission to collect slugs on their property. É. L'H. was supported by a fellowship from the Fonds de Recherche du Québec – Nature et Technologies (FRQNT), the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada, and the Fonds de Bourses en Sciences Biologiques (FBSB) of Université de Montréal. This research was supported by a research grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) to B. A. (#238600).

Appendix I

Distribution of *Arion subfuscus s. l.* species complex in Quebec as determined by Chichester and Getz (1969) compared to the distribution revealed in the present study

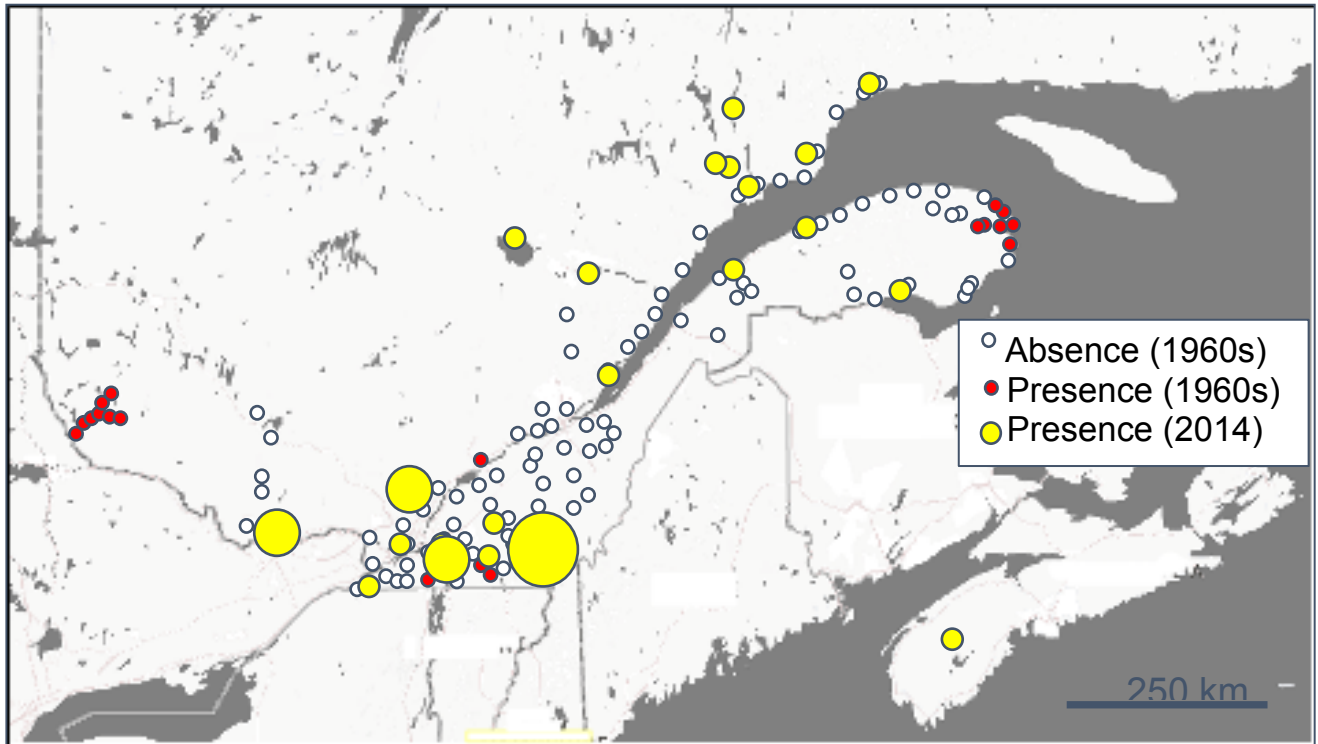


Figure I.1. Distribution of the *Arion subfuscus s. l.* species complex in Quebec as determined by Chichester and Getz (1969) compared to the distribution revealed in the present study.

Discussion

Abondance des espèces trouvées

La répartition des espèces du complexe d'*A. subfuscus s. l.* telle qu'observée dans ce projet a permis d'apporter une nouvelle manière d'en comprendre la dispersion au Québec. Les modes de dispersions suggérés peuvent même être appliqués à de nombreuses autres espèces de gastéropodes introduits en Amérique du Nord. En effet, avec l'identification moléculaire des espèces, lignées et haplotypes mitochondriaux, ce complexe s'est avéré être composé de plusieurs espèces et haplotypes mitochondriaux avec des répartitions à grande échelle, mais des abondances sur le territoire très différentes. La répartition d'*A. subfuscus s. s.* est très informative des manières dont les limaces du complexe d'*A. subfuscus s. l.* se dispersent. Même si très localisés, certains haplotypes ont une répartition disjointe, avec des populations séparées de plusieurs centaines de kilomètres. Cette répartition montre que plutôt que de se disperser de manière active à partir d'un point d'introduction initial, ces limaces sont probablement transportées de façon passive sur le territoire par les activités humaines comme suggéré par Chichester et Getz (1969). Ces modes de dispersion peuvent s'avérer très efficaces chez certaines espèces dont la capacité active de dispersion est très limitée, mais qui ont pourtant été dispersées et introduites sur plusieurs continents (Suarez, Holway et Case 2001).

Ici, le complexe d'*A. subfuscus s. l.* est un modèle fort intéressant dans la compréhension de la dispersion des organismes lents, puisque d'un côté *A. subfuscus s. s.* est présent de façon très ponctuelle sur des sites éloignés ce qui permet de conclure à une dispersion passive des limaces, et d'un autre côté, *A. fuscus*, qui est probablement transporté de manière similaire, a réussi à coloniser tout le sud du Québec et à devenir pratiquement omniprésent. *Arion fuscus* est donc

un exemple d'espèce à la capacité active de dispersion limitée qui a tout de même réussie à envahir le sud du Québec en une cinquantaine d'années. Les matières par lesquelles les limaces sont transportées d'un endroit à l'autre sont probablement différentes selon la région. Par exemple, bien que le transport sur des plantes ornementales soit possible dans le sud du Québec, il serait fort surprenant sur les sites les plus nordiques échantillonnés, certains étant relativement éloignés des villes. Dans ce cas, le transport du bois et de la machinerie par les activités de foresterie, ainsi que le transport de matériaux de construction venant du sud seraient plus probables. Il est à noter que la limite nordique du complexe d'*A. subfuscus s. l.* au Québec n'a pas été déterminée, puisque des spécimens ont été trouvés sur le site le plus nordique échantillonné. Il pourrait être intéressant de tester si la limite nordique réelle du complexe au Québec est déterminée par les conditions climatiques ou par les activités anthropogéniques qui participent à la dispersion passive de ces limaces.

Comme il s'agit de la première étude au Québec à faire la différence entre les différentes espèces et lignées mitochondriales, il est impossible de connaître les années d'introduction de chacune d'entre elles. Les différences de répartition au niveau du nombre de site occupé par chaque espèce pourraient donc être dues, tout simplement, à des temps d'introduction différents, avec *A. fuscus* introduit il y a plus longtemps que les deux lignées d'*A. subfuscus s. s.* Cette différence pourrait également être attribuée à des différences au niveau des traits d'histoire de vie qui permettraient à certaines espèces d'accroître leur aire de répartition de façon plus efficace, soit en ayant un plus fort potentiel de dispersion active, soit en ayant des différences au niveau de leur valeur adaptative. Une autre alternative à envisager serait des différences de plasticité phénotypique qui permettraient à *A. fuscus* de s'acclimater à une plus grande gamme d'environnements qu'*A. subfuscus s. s.* qui serait une espèce plus restreinte à certains types de

milieux. Il est tout de même à noter qu'au moins deux espèces/lignées, *A. fuscus* et la lignée S1 d'*A. subfuscus s. s.*, ont été trouvées dans une large gamme de latitudes qui présentent des zones bioclimatiques fort différentes (Ministère des Forêts, de la Faune et des Parcs du Québec 2016). Il semble donc être possible pour les deux espèces d'occuper des régions qui présentent une certaine plage de climats (Ministère des Forêts, de la Faune et des Parcs du Québec 2006) et de zones de végétation, allant de la forêt décidue à la forêt boréale (Ministère de la Faune, des Forêts et des Parcs du Québec 2006). Les deux espèces semblent donc être généralistes à ce niveau. En Europe, *A. fuscus* présente une répartition plus nordique qu'*A. subfuscus s. s.*, bien que la répartition des deux espèces se chevauchent sur une grande partie de l'Europe (Pinceel *et al.* 2004, 2005a, 2005b). Au niveau des habitats, les deux espèces ont des densités d'individus différentes pour les mêmes types d'habitat (et ce pour plusieurs types d'habitat) (Kappes et Schilthuizen 2014). De plus, en Europe, il a été observé qu'*A. fuscus* est une espèce plutôt hygrophile, tandis qu'*A. subfuscus s. s.* serait principalement limité aux forêts (Kappes 2006). Bien que dans le cadre de ce projet de maîtrise, les types d'habitats où ces espèces ont été trouvées ne sont pas mentionnés, il ne semble pas qu'ils correspondent à ce qui est observé en Europe, surtout pour *A. subfuscus s. s.* qui a été récolté sur quelques sites complètement ouverts comme des pelouses ou des champs. Des analyses seront toutefois nécessaires afin de déterminer les caractéristiques des habitats qui sont requises par les deux espèces au Québec. En effet, les différences de répartition pourraient être liées au fait qu'une espèce est plus généraliste que l'autre au niveau des habitats occupés. Ainsi, après avoir été dispersée de manière passive par les activités humaines, l'espèce plus généraliste aura une chance plus grande de s'établir, puisqu'un plus grand nombre d'habitats pourront satisfaire ses besoins écologiques, comparativement à l'espèce spécialiste qui aura plus de chance de tomber un type d'habitat non-

favorable. Aussi, deux modes de reproduction ont été proposés chez le complexe *d'A. subfuscus s. l.*, c'est-à-dire la fécondation croisée et l'autofécondation, qui avait été déterminée à l'aide d'allozyme dans des populations différentes qui présentaient des patrons de coloration différents (McCracken et Selander 1980). Il pourrait donc s'agir d'espèces distinctes. Ainsi, si une des deux espèces a la possibilité de faire de l'autofécondation et l'autre non, l'introduction d'un seul individu de l'espèce autoféconde serait suffisant pour produire une nouvelle population, tandis que plusieurs individus seraient requis pour des espèces à fécondation croisée.

Origines

Dans le nord de l'Amérique du Nord, l'origine précise des gastéropodes introduits est pratiquement inconnue, mis à part certains cas isolés qui ont été soit introduits de façon volontaires (Whitson 2005) ou d'espèces dont l'introduction a été liée à l'importation de biens en particulier (Poulin 1967). C'est le cas notamment d'une espèce d'*Arion* de la région de Sherbrooke dans le sud du Québec (Poulin 1967). Cette espèce a été introduite via l'importation de vitres dans des caisses de bois remplies de paille humide en provenance d'Angleterre. Des observations d'introduction de cette espèce ont donc été faites à plusieurs endroits où les fenêtres fournies par une compagnie en particulier ont été installées. Sinon, l'origine des gastéropodes a très rarement été déterminée par des méthodes moléculaires en Amérique du Nord (e.g. Pinceel *et al.* 2005c). Au Québec, il s'agit, à notre connaissance, de la première étude à utiliser des méthodes moléculaires pour déterminer l'origine des populations sources de gastéropodes exotiques. De plus, comme plusieurs mentions d'espèces sont très anciennes en Amérique du Nord (Pilsbry 1948, Binney 1842), les observations directes sont impossibles. De telles méthodes pourraient être appliquées dans le futur pour d'autres taxons, par contre, peu d'autres espèces ont reçu l'attention accordée au complexe *d'A. subfuscus s. l.* en Europe (Pinceel *et al.*

2004, 2005a, 2005b), les données dans les populations sources étant essentielles dans ce type de projet afin d'avoir un comparatif avec les populations exotiques des mêmes espèces.

Les résultats révèlent que les séquences des haplotypes détectés au Québec et en Nouvelle-Écosse correspondent exactement à celles d'origines européennes. De plus, une faible diversité mitochondriale est présente au Québec lorsque comparée à celle d'Europe (Pinceel *et al.* 2005a, 2005b). Le plus faible nombre d'haplotypes mitochondriaux pour le 16S rDNA est dû à un effet fondateur relativement important comme ce qui avait été observé pour le complexe dans le nord-est des États-Unis (Pinceel *et al.* 2005c). Certains auteurs avaient suggéré que le complexe d'*A. subfuscus s. l.* pourrait être indigène en Amérique du Nord pour deux raisons. Premièrement, ces limaces sont présentes sur des îles inhabitées au large de Terre-Neuve (Brooks et Brooks 1940). Cependant, il a été suggéré que la présence du complexe sur les îles inhabitées pouvait être due à l'introduction de limaces par les ballasts jetés par des bateaux en provenance d'Europe (Lindroth 1957). Deuxièmement, ces limaces occupent des habitats forestiers naturels en Amérique du Nord (Grimm *et al.* 2009), notamment des habitats éloignés des centres urbains comme dans la forêt boréale ce qui a aussi contribué à penser que ce complexe pouvait être indigène. Les résultats obtenus dans ce projet permettent d'éliminer ce scénario, puisqu'en plus d'avoir une diversité mitochondriale plus faible, presque tous les haplotypes ont des séquences identiques à celles de spécimens européens, les deux haplotypes restant étant seulement différents d'une seule mutation des séquences européennes. Si le complexe avait été indigène, il aurait été attendu que les haplotypes présents au Québec auraient divergés de ceux d'origine européenne, ce qui n'est pas le cas.

Les séquences des huit haplotypes trouvés ont été comparées aux séquences disponibles sur Genbank. Les localités mentionnées sur Genbank, ainsi que les données sur la répartition de ces

haplotypes fournies par Pinceel *et al.* (2004, 2005a, 2005b, 2005c) sont ici compilées afin de connaître l'origine européenne des haplotypes présents au Québec. Les haplotypes appartenant à *A. fuscus* au Québec sont principalement originaires d'Europe centrale et d'Europe du Nord. Les haplotypes d'*A. subfuscus s. s.* trouvés au Québec, eux, sont tous originaires du nord de l'Europe de l'Ouest. L'haplotype très commun des États-Unis, non détecté en Europe (Pinceel *et al.* 2005), n'a été retrouvé que sur un site près de la frontière américaine. Cet haplotype provient fort probablement des États-Unis. Il est intéressant de noter qu'il a été trouvé sur la propriété d'une université anglophone que plusieurs États-Uniens côtoient.

Donc, avec la présence d'haplotypes européens ayant des aires de répartition qui ne se chevauchent pas, il est possible de déterminer que le nombre minimal d'introductions différentes nécessaires pour créer la diversité mitochondriale trouvée au Québec est de trois introductions en provenance de régions européennes différentes et d'une autre en provenance des États-Unis. Chichester et Getz (1969), en se basant sur les différents patrons de coloration du complexe d'*A. subfuscus s. l.* en Amérique du Nord, étaient également venus à la conclusion que plusieurs introductions avaient eu lieu. Ici, les données moléculaires ont permis de confirmer cette hypothèse, mais en plus, l'origine des haplotypes a été déterminée de façon relativement précise. Cette information pourra s'avérer être pertinente pour mieux cibler les caractéristiques écologiques des populations sources des espèces présentes au Québec, mais aussi afin de limiter l'entrée d'autres espèces de gastéropodes en provenance de ces régions par l'importation de biens. En effet, plusieurs mentions ont été faites de limaces interceptées (Barr *et al.* 2009, Rowson *et al.* 2014a) ou introduites (Poulin 1967) par le biais de produits importés (principalement d'origine végétale).

Expansion du complexe

Depuis les années 1960, aucun inventaire à grande échelle n'avait été tenté afin de déterminer la répartition des espèces de limace au Québec. Dans ce projet, des individus du complexe d'*A. subfuscus s. l.* ont été trouvés dans toutes les régions échantillonnées, révélant un complexe d'espèces largement réparti et bien établi jusqu'à des latitudes relativement nordiques, c'est-à-dire au moins jusqu'au 50^{ème} parallèle nord. Ces résultats contrastent avec la répartition du complexe telle que déterminée par Chichester et Getz (1969) il y a une cinquantaine d'années. En effet, en 1965 et 1966, malgré un échantillonnage intensif couvrant tout le sud du Québec, jusqu'aux alentours de Sept-Îles sur la Côte-Nord, le complexe n'a été détecté que dans quelques régions très localisées avec des spécimens n'étant trouvés que dans l'ouest au Témiscamingue, dans l'est sur la péninsule Gaspésienne, ainsi que dans l'extrême sud du Québec (Chichester et Getz 1969). Ce constat est particulièrement surprenant, car Chichester et Getz (1969) n'ont détecté aucune limace du complexe dans la plupart des régions où des spécimens ont justement été récoltés dans le cadre de la présente étude. Il s'agit d'une expansion surprenante venant d'un animal aux capacités de dispersion active très limitées. L'espèce commune qui a connu la plus grande expansion à la fois en termes de distance et d'occupation du territoire est *A. fuscus* ; *Arion subfuscus s. s.* étant trouvé de façon ponctuelle. D'autres espèces de gastéropodes ont une répartition au Québec encore relativement conscrîte à certaines régions. Par exemple, l'escargot *Cepaea nemoralis* est principalement connu de la région de Montréal (Örstan 2010). Cette étude montre donc que certains gastéropodes peuvent connaître des expansions de leur répartition dans des laps de temps relativement courts.

Allopatrie

Arion fuscus et *A. subfuscus s. s.* ont été généralement trouvés en allopatrie, et ce, autant à grande échelle qu'à petite échelle, où des sites espacés de quelques kilomètres seulement n'arborent pas les mêmes espèces, certains où *A. subfuscus s. s.* est carrément entouré par des sites où vit *A. fuscus*. Ceci exclut l'hypothèse que les deux espèces n'auraient pas eu le temps de se rencontrer dû à leur historique d'introduction. Il semblerait plutôt que des causes écologiques fassent en sorte que les deux espèces soient en allopatrie. Certaines espèces de limaces sont connues pour être agressives envers leurs congénères de même espèce ou d'espèces différentes (Rollo et Wellington 1979). Ces agressions peuvent même mener à de l'exclusion spatiale, puisqu'une espèce pourra chasser une autre des meilleures cachettes disponibles comme celles à proximité de nourriture (Rollo et Wellington 1979). Rollo et Wellington (1979) mentionnent d'ailleurs qu'*Arion subfuscus s. l.* est une des limaces les plus agressives. Des causes liées à des préférences d'habitats pourraient aussi être une explication. Finalement, dans cette étude, l'allopatrie des deux espèces a été constatée, mais les causes restent à déterminer.

Diversités taxonomiques liées aux activités humaines

La diversité taxonomique des espèces exotiques est fortement liée aux activités humaines (Taylor et Irwin 2004). Cette tendance a été montrée chez les limaces du complexes d'*A. subfuscus s. l.* En comparant les haplotypes mitochondriaux trouvés dans le nord-est des États-Unis (Pinceel *et al.* 2005c) à ceux détectés au Québec, une diversité très différente a été observée, malgré que les deux régions soient adjacentes. En effet, l'haplotype très commun qui avaient été trouvé sur tous les sites des États-Unis (Pinceel *et al.* 2005c), n'a été détecté que près de la frontière américaine sur un site seulement au Québec. Les autres haplotypes trouvés au

Québec n'avaient pas été détectés dans l'étude de Pinceel *et al.* (2005c). En plus, seule la lignée mitochondriale S1 d'*A. subfuscus s. s.* a été trouvée dans le nord-est des États-Unis (Pinceel *et al.* 2005c), tandis qu'au Québec c'est *A. fuscus* qui est l'espèce retrouvée sur la très grande majorité des sites. Les lignées S1 et S2 d'*A. sunfuscus s. s.* n'ont été trouvées que sur un petit nombre de sites. Les événements menant à l'introduction de ces limaces au Québec et dans le nord-est des États-Unis semblent donc être complètement différentes. Il est tout de même à noter qu'*A. fuscus* et *A. subfuscus s. s.* ont également été répertoriés au États-Unis dans un projet de barre-code d'ADN pour identifier les espèces exotiques de limaces des États-Unis, mais leurs points d'échantillonnage n'est pas présenté (Barr *et al.* 2009). Cette information, couplée au fait que les espèces sont trouvées en allopatrie au Québec, mais aussi souvent en Europe (Pinceel *et al.* 2004) montre l'importance d'une identification précise des espèces présentes. En effet, les différents impacts écologiques associés à ce complexe (Rathcke 1985, Banville 1987, Hammond et Byers 2002, Gardescu 2003, Côté, Ferron et Gagnon 2005, Cameron 2009, Dunphy, Prior et Frederickson 2016;) ne peuvent être assumés comme étant les mêmes selon les régions ou les sites différents puisque les espèces impliquées sont potentiellement différentes.

Limites de l'études et questions soulevées

Dans ce projet de maîtrise, plusieurs régions du Québec n'ont pas été échantillonnées telles que le nord-ouest et nord du Québec. De plus, l'identité des espèces et des lignées mitochondriales des limaces du complexe d'*Arion subfuscus s. l.* demeure inconnue dans une grande partie de l'Amérique du Nord. Les résultats obtenus montrent l'importance de tels investigations, puisque la diversité mitochondriale des espèces trouvées au Québec s'est avérée être différente de celle révélée par les études antérieures dans le nord-est des États-Unis. De ce fait, l'identification

moléculaires des espèces et des lignées mitochondriales reste pertinente dans les régions non-couverte par la présente étude. Il aurait été pertinent d'échantillonner sur la péninsule gaspésienne, ainsi qu'au Témiscamingue, là où Chichester et Getz (1969) avaient trouvés des spécimens du complexe dans les années 1960. Cependant, leur identification n'aurait pas permis de déterminer avec certitude les espèces présentes dans les années 1960 puisque les populations de l'époque auraient pu ne pas persister ou laisser place à d'autres espèces.

Les résultats ont été obtenus à l'aide de spécimens récoltés principalement par fouille active. Il n'est donc pas possible de savoir si la densité des limaces reste constante sur le territoire. Aussi, il a été montré qu'*A. subfuscus s. s.* et *A. fuscus* sont généralement trouvés en allopatrie. Cependant, comme les causes en sont inconnus, des analyses au niveau des habitats occupés par chacune des espèces seraient requises afin de déterminer si les deux espèces peuvent occuper les mêmes habitats ou si ces deux espèces s'excluent réellement. Il a été montré qu'au niveau mitochondrial, un effet fondateur avait eu lieu. Par contre, au niveau nucléaire, la diversité génétique n'a pas été déterminée. Une comparaison de la diversité nucléaire européenne et nord-américaine permettrait de voir si un effet fondateur a également eu lieu au niveau nucléaire, mais aussi de comprendre l'implication des multiples introductions dans la diversité nucléaire nord-américaine. Finalement, *A. fuscus* s'est avéré être l'espèce la plus commune. Les déterminants du succès d'établissement et de colonisation de cette espèce devront donc être investigués.

Bibliographie

- Banville, G. 1987. Ecologie de deux espèces introduites de limaces *Arion subfuscus* et *Deroceras reticulatum* dans les fraisières du Québec (Mémoires de maîtrise). Université Laval Faculté Des Sciences et de Génie, 51: 319–325.
- Barr, N.B., A. Cook, P. Elder, J. Molongoski, D. Prasher et D.G. Robinson. 2009. Application of a DNA barcode using the 16S rRNA gene to diagnose pest *Arion* species in the USA. *Journal of Molluscan Studies* 75: 187-191.
- Baur, A. et B. Baur. 1990. Are roads barriers to dispersal in the land snail *Arianta arbustorum*? *Canadian Journal of Zoology* 68: 613-617.
- Benbouza, H., J.M. Jacquemin, J.P. Baudoin & G. Mergeai. 2006. Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. *Biotechnologie, agronomie, société et environnement* 10(2): 77-81.
- Beyer, W.N. et D.M. Saari. 1977. Effect of tree species on the distribution of slugs. *Journal of Animal Ecology* 46(3): 697-702.
- Beyer, W.N. et D.M. Saari. 1978. Activity and ecological distribution of the slug, *Arion subfuscus* (Draparnaud) (Stylommatophora, Arionidae). *American Midland Naturalist* 100(2): 359-367.
- Bickford, D., D.J. Lohman, N.S. Sodhi, P.K. Ng, R. Meier, K. Winker, K.K. Ingram et I. Das. 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in ecology & evolution* 22(3): 148-155.
- Binney, A. 1842. Descriptions of some of the species of naked air-breathing Mollusca inhabiting the United States. *Journal of the Boston Society of natural History* 4: 163-174.

- Boag, D.A. 1986. Dispersal in pond snails: potential role of waterfowl. *Canadian Journal of Zoology* 64: 904-909.
- Bohlen, P.J., P.M. Groffman, T.J. Fahey, M.C. Fisk, E. Suárez, D.M. Pelletier et R.T. Fahey. 2004. Ecosystem consequences of exotic earthworm invasion of north temperate forests. *Ecosystems* 7(1): 1-12.
- Brady, J.K. et T.A. Pearce. 2007. Terrestrial slugs in strip mined and unmined forested land, Tuscarawas County, Ohio, USA. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia* 156(1): 117-122.
- Brooks, S.T. et Brooks, B. W. 1940. Geographical distribution of the recent Mollusca of Newfoundland. *Ann. Carnegie Mus.* 28: 53-73.
- Cameron, R. 2009. Are non-native gastropods a threat to endangered lichens? *Canadian Field-Naturalist* 123: 169-171.
- Chichester, L.F. et L.L. Getz. 1969. The zoogeography and ecology of arionid and limacid slugs introduced into northeastern North America. *Malacologia* 7: 313-346.
- Chichester, L.F. et L.L. Getz. 1973. The terrestrial slugs of northeastern North America. *Sterkiana* 51: 11-42.
- Côté, M., J. Ferron et R. Gagnon. 2005. Invertebrate predation of postdispersal seeds and juvenile seedlings of black spruce (*Picea mariana*) in the boreal forest of eastern Canada. *Canadian journal of forest research* 35(3): 674-681.
- Dlugosch, K.M. et I.M. Parker. 2008. Founding events in species invasions: genetic variation, adaptative evolution, and the role of multiple introductions. *Molecular Ecology* 17: 431-449.

- Dörge, N., C. Walther, B. Beinlich et H. Plachter. 1999. The significance of passive transport for dispersal in terrestrial snails (Gastropoda, Pulmonata). *Zeitschrift für ökologie und naturschutz* 8: 1-10.
- Draparnaud, J.P.R. 1805. Histoire naturelle des mollusques terrestres et fluviatiles de la France. 164 p.
- Dunphy, S.A.M., K.M. Prior et M.E. Frederickson. 2016. An invasive slug exploits an ant-seed dispersal mutualism. *Oecologia* 181(1) : 149-159.
- Environnement Canada. 2012. Programme de partenariat sur les espèces exotiques envahissantes, Rapport 2005-2010, 52 p.
- Fischer, S.B., P. Poschlod et B. Beinlich. 1996. Experimental studies on the dispersal of plants and animals on sheep in calcareous grasslands. *Journal of Applied Ecology* 33(5): 1206-1222.
- Fisher, R.A. 1925. Statistical methods for research workers, Edinburgh: Genesis Publishing Pvt. Oliver and Boyd Ltd.
- Gao, L. X., Y. P. Geng, B. Li, J. K. Chen, et J. Yang. 2010. Genome-wide DNA methylation alterations of *Alternanthera philoxeroides* in natural and manipulated habitats : implications for epigenetic regulation of rapid responses to environmental fluctuation and phenotypic variation. *Plant Cell and Environment* 33: 1820-1827.
- Gardescu, S. 2003. Herbivory, disease, and mortality of sugar maple seedlings. *Northeastern Naturalist* 10(3): 253-268.
- Garrido, C., J. Castillejo et J. Iglesias. 1995. The *Arion subfuscus* complex in the eastern part of the Iberian Peninsula, with redescription of *Arion subfuscus* (Draparnaud 1805). *Arch. Molluskenkunde* 124: 103-118.

- Gleich, J.G. et F.F. Gilbert. 1976. A survey of terrestrial gastropods from Central Maine. *Canadian Journal of Zoology* 54(5): 620-627.
- Godan D. 1983. Pest Slugs and Snails : Biology and control. SpringerVerlag, New York, 445 p.
- Gotelli, N.J., E.M. Hart & A.M. Ellison. 2015. EcoSimR: Null model analysis for ecological data. R package version 0.1.0.
- Grimm, F.W., R.G. Forsyth, F.W. Schueler et A. Karstad. 2009. Identification des escargots et des limaces terrestres au Canada, Espèces introduites et genres indigènes. Agence canadienne d'inspection des aliments, 168 p.
- Gurevitch, J. et D.K. Padilla. 2004. Are invasive species a major cause of extinctions? *TRENDS in Ecology and Evolution* 19(9): 470-474.
- Hammond, R.B. et R.A. Byers. 2002. Agrolimacidae and Arionidae as pests in conservation-tillage soybean and maize cropping in North America (chapitre du livre : Molluscs as Crop Pests). G.M. Barker, 301-314.
- Hight, S. D., J.E. Carpenter, K.A. Bloem, S. Bloem, R.W. Pemberton, R. W et P. Stiling. 2002. Expanding geographical range of *Cactoblastis cactorum* (Lepidoptera: Pyralidae) in North America. *Florida entomologist*, 85(3): 527-529.
- Holland, R. E. 1993. Changes in planktonic diatoms and water transparency in Hatchery Bay, Bass Island area, western Lake Erie since the establishment of the zebra mussel. *Journal of Great Lakes Research* 19(3): 617-624.
- Hornung, E., G. Majoros, Z. Fehér et A. Varga. 2003. An overview of the *Vertigo* species in Hungary: their distribution and habitat preferences (Gastropoda, Pulmonata: Vertiginidae). *Heldia* 5: 51-57.

- Johnson, L.E. et J.T. Carlton. 1996. Post-establishment spread in large-scale invasions: dispersal mechanisms of the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. *Ecology* 77(6): 1686-1690.
- Jordaens, K., J. Pinceel, H. Kriekemans & T. Backeljau. 2006. Accurate identification of cryptic slug taxa of the *Arion subfuscus/fuscus* complex by PCR-RFLP (Pulmonata: Arionidae). *Journal of molluscan studies* 72(3): 323-325.
- Jordaens, K., J. Pinceel, N. Van Houtte, K. Breugelmans et T. Backeljau. 2010. *Arion transsylvanus* (Mollusca, Pulmonata, Arionidae): rediscovery of a cryptic species. *Zoologica Scripta* 39: 343-362.
- Jordaens, K., P. Van Riel, S. Geenen, R. Verhagen et T. Backeljau. 2001. Food-induced body pigmentation questions the taxonomic value of colour in the self-fertilizing slug *Carinarion* spp. *Journal of Molluscan Studies* 67: 161-167.
- Kappes, H. 2006. Relations between forest management and slug assemblages (Gastropoda) of deciduous regrowth forests. *Forest Ecology and Management* 237(1): 450-457.
- Kappes, H. et M. Schilthuizen. 2014. Habitat effects on slug assemblages and introduced species. *Journal of Molluscan Studies* 80(1), 47-54.
- Keller S.R. et D.R. Taylor. 2008. History, chance and adaptation during biological invasion: separating stochastic phenotypic evolution from response to selection. *Ecology Letters* 11: 852-866.
- Kerney, M.P. et R.A.D. Cameron. 2006. Guide des escargots et limaces d'Europe. Delachaux et Niestlé, 370 p.
- Kirchner, C., R. Krätzner et F.W. Welter-Schultes. 1997. Flying snails – how far can *Truncatellina* (Pulmonata: Vertiginidae) be blown over the sea? *Journal of Molluscan Studies* 63: 479-487.

- Lavergne, S. et J. Molofsky. 2007. Increased genetic variation and evolutionary potential drive the success of an invasive grass. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 3883-3888.
- Liebhold, A.M., J.A. Halverson et G.A. Elmes. 1992. Gypsy moth invasion in North America: a quantitative analysis. *Journal of Biogeography* 19: 513-520.
- Lindroth, C.H. 1957. The faunal connections between Europe and North America. Wiley & Sons, New York, 344 p.
- Maciorowski, G., M. Urbańska et H. Gierszal. 2012. An example of passive dispersal of land snails by birds – short note. *Folia Malacologica* 20(2): 139-141.
- Maunder, J.E. et A.J. Voitek. 2010. What do we know about slugs and mushrooms? *Fungi* 3(3): 36-44.
- Ministère des Forêts, de la Faune et des Parcs du Québec (MFFP). Consulté le 8 septembre 2016. Repéré à <https://www.mffp.gouv.qc.ca/publications/forets/connaissances/zone-f.pdf>
- McCracken, G.F. et R.K. Selander. 1980. Self-fertilization and monogenic strains in natural populations of terrestrial slugs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77(1): 684-688.
- McDonnell, R.J., P. Rugman-Jones, T. Backeljau, K. Breugelmans, K. Jordaens, R. Stouthamer, T. Paine et M. Gormally. 2011. Molecular identification of the exotic slug *Arion subfuscus sensus stricto* (Gastropoda: Pulmonata) in California, with comments on the source location of introduced populations. *Biological Invasions* 13: 61-66.

- Meirmans, P. G., M. Lamothe, M.C. Gros-Louis, D. Khasa, P. Périnet, J. Bousquet et N. Isabel. 2010. Complex patterns of hybridization between exotic and native North American poplar species. *American Journal of Botany* 97(10): 1688-1697.
- Nekola, J.C. 2009. Conservation Prioritization of the Ontario and Quebec Land Snail Faunas, Committee On the Status of Endangered Wildlife In Canada (COSEWIC), 120 p.
- Nekola, J.C. 2014. Overview of the North American Terrestrial Gastropod Fauna*. *American Malacological Bulletin* 32(2): 225-235.
- Orita, M., H. Iwahana, H. Kanazawa, K. Hayashi & T. Sekiya. 1989. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86(8): 2766-2770.
- Pearce, T., R.S. Mulvihill et K.A. Porter. 2012. Land slugs (Gastropoda: Pulmonata) on birds demonstrate dispersal potential. *The Nautilus* 126(1): 38-40.
- Pilsbry, H.A. 1948. Land Mollusca of North America (north of Mexico). The Academy of Natural Sciences of Philadelphia. Vol. 2, part 2, 521-1112 p.
- Pinceel, J., K. Jordaens, N. Van Houtte, A.J. De Winter et T. Backeljau. 2004. Molecular and morphological data reveal cryptic taxonomic diversity in the terrestrial slug complex *Arion subfuscus/fuscus* (Mollusca, Pulmonata, Arionidae) in continental north-west Europe. *Biological Journal of the Linnean Society* 83: 23-38.
- Pinceel, J., K. Jordaens, M. Pfenninger et T. Backeljau. 2005a. Rangewide phylogeography of a terrestrial slug in Europe: evidence for Alpine refugia and rapid colonization after the Pleistocene glaciations. *Molecular Ecology* 14: 1133-1150.

- Pinceel, J., K. Jordaens et T. Backeljau. 2005b. Extreme mtDNA divergences in a terrestrial slug (Gastropoda, Pulmonata, Arionidae): accelerated evolution, allopatric divergence and secondary contact. *Journal of Evolutionary Biology* 18: 1264-1280.
- Pinceel, J., K. Jordaens, N. Van Houtte, G. Bernon et T. Backeljau. 2005c. Population genetics and identity of an introduced terrestrial slug: *Arion subfuscus s.l.* in the north-east USA (Gastropoda, Pulmonata, Arionidae). *Genetica* 125: 155-171.
- Poulin, G. 1967. *Écologie d'Arion ater*. (Mémoires de maîtrise) Université de Sherbrooke Faculté des sciences.
- Qunteiro, J., J. Rodriguez-Castro, J. Castillejo, J. Iglesias-Piñeiro et M. Rey-Méndez. 2005. Phylogeny of slug species of the genus *Arion*: evidence of monophyly of Iberian endemics and of the existence of relict species in Pyrenean refuges. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 43(2): 139-148.
- Rathcke, B. 1985. Slugs as generalist herbivores: tests of three hypotheses on plant choices. *Ecology* 66(3): 828-836.
- Rees, W.J. 1965. The aerial dispersal of Mollusca. *Proceedings of the Malacological Society of London* 36: 269-282.
- Regnier, C., B. Fontaine et P. Bouchet. 2009. Not knowing, not recording, not listing: numerous unnoticed mollusk extinctions. *Conservation Biology* 23(5): 1214-1221.
- Ricciardi, A., R.J. Neves et J.B. Rasmussen. 1998. Impending extinctions of North American freshwater mussels (Unionoida) following the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) invasion. *Journal of Animal Ecology* 67(4): 613-619.
- Robinson, D.G. 1999. Alien invasions: the effects of the global economy on non-marine gastropod introductions into the United States. *Malacologia* 41(2): 413-438.

- Rollo, C. D., et W. G. Wellington. 1979. Intra-and inter-specific agonistic behavior among terrestrial slugs (Pulmonata: Stylommatophora). *Canadian Journal of Zoology*, 57(4) : 846-855.
- Rowson, B., R. Anderson, J.A. Turner et W.O. Symondson. 2014a. The slugs of Britain and Ireland: undetected and undescribed species increase a well-studied, economically important fauna by more than 20%. *PloS one* 9(4): e91907.
- Rowson, B., J. Turner, R. Anderson et B. Symondson. 2014b. Slugs of Britain and Ireland, Identification, understanding and control, FSC, 136 p.
- Örstan, A. 2010. Gastropoda, Pulmonata, Helicidae, *Cepaea nemoralis* (Linnaeus, 1758): New records for Montreal, Canada. *Check List* 6(1): 054.
- Sambrook J., E.F. Fritsch et T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. Vol. 2, 14-9 p.
- Shikov, E.V. et A.A. Vinogradov. 2013. Dispersal of terrestrial gastropods by birds during the nesting period. *Folia Malacologica* 21(2): 105-110.
- Stone, L. et A. Roberts. 1990. The checkerboard score and species distributions. *Oecologia* 85(1): 74-79.
- Suarez, A.V., D.A. Holway et T.J. Case. 2001. Patterns of spread in biological invasions dominated by long-distance jump dispersal: insights from Argentine ants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98(3): 1095-1100.
- Sysoev, A. et A. Schileyko. 2009. Land snails and slugs of Russia and adjacent countries. Pensoft Publishers, 454 p.

- Taylor, B.W. et R.E. Irwin. 2004. Linking economic activities to the distribution of exotic plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(51): 17725-17730.
- Thompson, J.D., D.G. Higgins et T.J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research* 22(22): 4673-4680.
- Tsutsui, N.D., A.V. Suarez, D.A. Holway et T.J. Case. 2000. Reduced genetic variation and the success of an invasive species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 5948-5953.
- Union internationale pour la conservation de la nature (IUCN). 2011. Invasive species. Consulté le 15 mars 2013. Répéré à <https://www.iucn.org/theme/species/our-work/invasive-species>
- Vagvolgyi, J. 1975. Body size, aerial dispersal, and origin of the Pacific land snail fauna. *Systematic Zoology* 24(4): 465-488.
- Waldén, H.W. 1965. Terrestrial faunistic studies in Sweden. *Proceedings of the First European Malacological Congress* 95-109.
- Wehtje, W. 2003. The range expansion of the great-tailed grackle (*Quiscalus mexicanus* Gmelin) in North America since 1880. *Journal of Biogeography* 30(10): 1593-1607.
- Wesselingh, F.P., G.C. Cadée et W. Renema. 1999. Flying high: on the airborne dispersal of aquatic organisms as illustrated by the distribution histories of the gastropod genera *Tryonia* and *Planorbarius*. *Geologie en Mijnbouw* 78: 165-174.

- Whitson, M. 2005. *Cepaea nemoralis* (Gastropoda, Helicidae): the invited invader. *Journal of the Kentucky Academy of Science* 66(2): 82-88.
- Wilcove, D.S., D. Rothstein, J. Dubow, A. Phillips et E. Losos. 1998. Quantifying threats to imperiled species in the United States. *Bioscience* 48: 607-615.
- Wood, J.R., I.A. Dicki, H.V. Moeller, D. A. Peltze, K.I. Bonner, G. Rattray et J.M. Wilmshurst. 2015. Novel interactions between non-native mammals and fungi facilitate establishment of invasive pines. *Journal of Ecology* 103(1): 121-129.