

Université de Montréal

Développement d'une méthode PCR-SSCP pour caractériser
régime alimentaire des gastéropodes

Par Hinatea Arieu

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 2021

© Arieu, 2021

Université de Montréal

Département de Sciences Biologiques, Faculté des Arts et des Sciences

Ce mémoire intitulé

Développement d'une méthode PCR-SSCP pour caractériser le régime alimentaire des gastéropodes

Présenté par

Hinatea Ariey

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Jacques Brodeur

Président-rapporteur

Bernard Angers

Directeur de recherche

Yann Surget-Groba

Membre du jury

Résumé

Déterminer le régime alimentaire des gastéropodes terrestres est important étant donné leurs impacts écologiques et économiques. L'observation en nature est difficile, car les gastéropodes sont principalement actifs la nuit et sont de petite taille. De plus, l'analyse visuelle des contenus digestifs est compliquée car les gastéropodes broient leurs aliments, ne permettant pas une identification précise. L'objectif est de produire une méthode fiable et peu onéreuse pour déterminer le régime alimentaire des gastéropodes en milieu naturel. Le modèle, *Arion fuscus*, a été échantillonné au printemps dans quatre érablières anciennes du sud du Québec (Canada). Une approche basée sur l'ADN a été utilisée avec amplification par PCR d'un segment d'un gène chloroplastique. La diversité a été déterminée par électrophorèse sur gel non-dénaturant suivie d'un séquençage des variants d'intérêts pour identifier les plantes consommées. Pour les 52 limaces analysées, les PCR ont fonctionné avec succès et les extractions d'ADN de mêmes individus traités indépendamment ont montré les mêmes résultats sur les gels SSCP. Des résultats fiables ont été produits en quelques semaines et le nombre d'échantillons à séquencer a été limité, réduisant ainsi les coûts. Les résultats montrent une faible diversité végétale consommée (6 haplotypes) par *A. fuscus*; 78,8% des limaces ont uniquement consommé la même espèce de plante. Cette méthode peut permettre de meilleurs suivis des espèces consommées par les gastéropodes dans un contexte d'écologie de la conservation ou de contrôle des espèces nuisibles.

Mots-clés : régime alimentaire, *Arion fuscus*, analyses moléculaires, Sanger, SSCP, érablière.

Abstract

The diet of terrestrial gastropods is difficult to assess in nature because of their often-nocturnal activity and their small size. Moreover, visual analyzes of digestive contents are problematic because gastropods grind food into small particles, making visual identification unexploitable. Determining the gastropods' diet is nevertheless highly relevant because gastropods may have strong ecological and economic impacts. On the one hand, several species are listed endangered or critically endangered. On the opposite, numerous species are considered agricultural pests. The objective is to produce an accurate and inexpensive method to determine the diet of gastropods. More specifically, by using an approach based on PCR-amplified DNA followed by SSCP gels, it was possible to determine taxa diversity before Sanger sequencing, and thus reduce costs. We used *Arion fuscus* from four old maple forests sites in southern Quebec (Canada) as model to test the method. The 52 individuals' digestive contents analyzed resulted in a successful PCR amplification and independent DNA extractions from a given individual gave the same SSCP pattern. This method produced reliable results in a few weeks and at a low cost, making it possible to sequence only a few samples to know the plant species consumed by all individuals in the study. Results revealed a low diversity of plants consumed (6 haplotypes). 78.8% of the slugs harvested in spring consumed one and the same species of plant. This method enables the monitoring of plant species consumed by gastropods in conservation and agricultural pest control.

Key words: Diet, *Arion fuscus*, molecular analyzes, Sanger, SSCP, maple forest.

Table des matières

| | |
|---|-------------|
| Résumé..... | ii |
| Abstract..... | ii |
| Liste des tableaux..... | vi |
| Liste des figures..... | vii |
| Liste des abréviations | viii |
| Remerciements | x |
| Introduction..... | 1 |
| Pertinence de l'étude du régime alimentaire..... | 1 |
| Les méthodes pour caractériser le régime alimentaire..... | 2 |
| Espèces exotiques envahissantes et leurs impacts | 7 |
| Pression des gastéropodes sur le milieu..... | 9 |
| Objectifs..... | 11 |
| Le modèle biologique | 12 |
| Des milieux d'intérêts à protéger | 14 |
| Article: Developing a PCR-SSCP method based on digestive content to characterize diet of gastropods..... | 15 |
| Résumé..... | 16 |
| Abstract..... | 17 |

| | |
|--|-----------|
| Introduction..... | 18 |
| Material and methods..... | 24 |
| Results..... | 30 |
| Discussion..... | 34 |
| Discussion générale | 39 |
| Résultats de la méthode (SSCP/ Séquençage) | 39 |
| Diversité et alimentation | 40 |
| Améliorations et limitations..... | 43 |
| Applications de la méthode et débouchés | 45 |
| Conclusion | 48 |
| Bibliographie | 49 |

Liste des tableaux

Table 1: Primers used in this study. Segment lengths were determined according to *Arabidopsis thaliana*'s rbcL-gene..... 29

Table 2: Plant haplotypes detected using SSCPs from digestive contents of the 52 specimens collected on the four sites. Abundance of each haplotype is indicated as the number of individuals (and percentage of the sample) in which it was detected. 32

Table 3: Identification of plant haplotypes by sequencing. For each SSCP conformer, the GenBank accession number and the taxonomic identification is given..... 33

Liste des figures

Figure 1: Schematization of PCRs. Segment length were calculated on the chloroplast DNA of the model plant *Arabidopsis thaliana* on the *rbcL* gene. Amplification for SSCP created a 248 bp fragment. Amplification for sequencing was realized in two steps. A) The first round of amplification provided a 753 bp segment used as template for the second round. B) while those for the sequencing amplification provided a 654 bp segment which includes the 245 bp of SSCP..... 26

Figure 2: Example of patterns observed on a SSCP gel. Five samples are visible with two different haplotypes (patterns of samples a, b, c and e are identical and d is different).
..... 31

Liste des abréviations

| | |
|-----------|---|
| <i>A.</i> | <i>Arion</i> |
| BLAST | Basic Local Alignment Search Tool/ Outil de recherche d'alignement local de base |
| ca. | approximativement/approximately (<i>circa</i>) |
| cm | centimètre/centimeter |
| COI | Cytochrome c oxidase 1 |
| DNA | deoxyribonucleic acid/Acide désoxyribonucléique |
| dNTP | désoxynucléotide triphosphate/Doxynucleotide triphosphate |
| et al. | et les autres auteurs/and others (<i>et alii</i>) |
| etc. | et le reste (<i>et caetera</i>) |
| i.e. | c'est-à-dire (<i>id est</i>) |
| IRIC | Institut de Recherche en Immunologie et en Cancérologie/Institute for Research in Immunology and Cancer |
| ITS | Internal Transcribed Spacer |
| IUCN | Union Internationale pour la Conservation de la Nature/ international union for Conservation of Nature |
| km | kilomètre/kilometer |
| m | mètre/meter |
| matK | maturase K |
| mg | milligramme/milligram |
| min | minute/minute |

| | |
|----------|---|
| NCBI | National Center for Biotechnology Information/Centre National d'Information pour Biotechnologique |
| ng | nanogramme/nanogram |
| nmol/L | nanomol par litre/nanomoles per liter |
| pb | paire de base/base pair (bp) |
| PCR | Réaction de Polymérisation en Chaîne/Polymerase Chain Reaction |
| rbcL | ribulose biphosphate carboxylase Large chain |
| s | seconde/second |
| sd | écart type/standard deviation |
| s. l. | sens large (<i>sensus lato</i>) |
| sp. | espèce/species |
| s.s. | sens strict (<i>sensu stricto</i>) |
| SSCP | Polymorphisme de Conformation des Simples Brins / Single Strand Conformation Polymorphism |
| Taq | <i>Thermus aquaticus</i> |
| µL | microlitre/microliter |
| µmol/L | µmicromol par litre/micromoles per liter |
| 10x | dix fois concentré/concentrated ten times |
| % | pourcentage/percent |
| °C | degré Celsius/Celsius degree |
| & | et/and |
| 16S rDNA | ADN ribosomique 16S/16S ribosomal DNA |

Remerciements

Je tiens à remercier tout d'abord mon superviseur Bernard Angers et mon collègue, et ami, Érik L'Heureux qui m'ont accompagné tout au long de ce processus malgré mes erreurs et mes doutes. Ils ont su croire en moi jusqu'à la fin. Je veux aussi remercier le personnel académique qui a su être compréhensif et me guider tout au long de mon cheminement.

Le personnel responsable de l'échantillonnage des spécimens a joué un rôle essentiel dans cette maîtrise. Je suis reconnaissante pour la qualité de leur travail ainsi que pour le temps qu'ils m'ont offert pour que je puisse obtenir les spécimens et tout particulièrement à Andrée Nault qui s'est grandement impliquée dans la coordination de l'échantillonnage sur le terrain en collaboration avec Érik L'Heureux.

Je veux remercier notamment mon père qui, malgré la distance, a gardé espoir en moi, m'a aidé à surmonter les obstacles et à continuer à m'encourager pour avancer. Ma famille aussi a été une source de motivation pour moi.

J'ai aussi eu la chance d'être supportée par mon conjoint, Julian Wittische, qui m'a soutenue, réconfortée et encouragée moralement durant les épreuves du cheminement académique. Sa famille aussi a su m'aider à aller de l'avant et croire en mes capacités. Mes amis ont aussi joué un rôle important grâce à leur soutien et je veux aussi les remercier car ils ont su croire en moi et pour certains même me montrer l'exemple.

Introduction

Pertinence de l'étude du régime alimentaire

La caractérisation du régime alimentaire permet de répondre à de nombreuses questions. Le régime alimentaire permet de placer une espèce animale dans un réseau trophique selon les espèces qu'elle consomme, et ainsi d'identifier la pression qu'exerce l'animal sur les espèces sympatriques (Nielsen, Clare, Hayden, Brett, & Kratina, 2018). C'est grâce à l'identification du régime alimentaire que l'étude de Kartzinel et al. (2015) a permis de caractériser les différentes niches alimentaires occupées par les grands herbivores de la savane africaine, incluant le bétail qui est une espèce introduite, et la possible compétition pour les ressources. Ainsi, les grands herbivores montrent une alimentation similaire au sein de leur espèce mais l'alimentation diffère beaucoup entre les espèces (Kartzinel et al., 2015). L'étude de Kartzinel et al. (2015) souligne donc que le bétail exerce peu de pression compétitive via la consommation des ressources alimentaires sur les grands herbivores indigènes. Caractériser l'alimentation d'une espèce aide aussi à identifier les espèces réellement qui menacent réellement les cultures et la foresterie ainsi que de permettre l'élaboration de plans de contrôle (Berner, Blanckenhorn, & Körner, 2005). En Nouvelle-Zélande, la caractérisation du régime alimentaire des wetas, orthoptères endémiques (*Hemiandrus sp.*), a permis une réduction des dommages dans les vignobles (Nboyine, Boyer, Saville, & Wratten, 2019) par la transformation d'une agriculture monospécifique en une agriculture comportant des espèces alternatives retrouvées dans l'alimentation de l'insecte et des pièges (Nboyine et al., 2019). Un autre domaine dans lequel la caractérisation du régime alimentaire est

importante est l'écotoxicologie, car caractériser le régime alimentaire des prédateurs permet de suivre la bioaccumulation des polluants dans la chaîne alimentaire, et ainsi de mieux protéger les super-prédateurs et les consommateurs humains (Hall et al., 2020; Penicaud, Lacoue-Labarthe, & Bustamante, 2017).

Les méthodes pour caractériser le régime alimentaire

Les méthodes pour caractériser le régime alimentaire doivent être choisies en fonction des objectifs de l'étude. Les méthodes traditionnellement utilisées peuvent s'appliquer en milieu naturel ou en milieu contrôlé et dans certaines études les deux contextes expérimentaux sont utilisés complémentirement (Fritz, Hochwender, Lewkiewicz, Bothwell, & Orians, 2001; Rathcke, 1985). Sur le terrain, l'observation directe ou par le biais d'une caméra (Giovanni, Boal, & Whitlaw, 2007) des animaux est souvent utilisée pour des espèces facilement observables comme les grands animaux terrestres (Belovsky, 1984; Pineda-Munoz & Alroy, 2014) et cette approche permet de caractériser, par la même occasion, le comportement alimentaire (Birkhofer et al., 2017). L'installation de caméras près de cheminées hydrothermales des profondeurs a permis de mettre en évidence l'alimentation et le comportement alimentaire de trois espèces de crevettes (Segonzac, de Saint Laurent, & Casanova, 1993). Les traces laissées par les animaux peuvent aussi être interprétées, comme par exemple, les marques de dents (Birkhofer et al., 2017). L'analyse visuelle des contenus digestifs ou excréments reflète directement ce que l'animal a mangé ainsi que les proportions ingérées selon leur temps de digestion (Hayden, Harrod, & Kahilainen, 2014). L'utilisation de cage d'exclusion permet de cibler

certains consommateurs par leur taille ou leur comportement (Birkhofer et al., 2017; Good, 1992). En laboratoire, des expériences de choix alimentaires par la présentation de différents aliments peuvent être réalisées sous des conditions contrôlées, par exemple proposer des disques de feuilles de plusieurs espèces différentes à des gastéropodes (Cates & Orians, 2010; Morrison & Hay, 2011; Rathcke, 1985). L'intérêt principal est de pouvoir prendre des mesures tout au long de la période d'alimentation de l'animal pour, par exemple, suivre la tolérance de l'herbivore lors de la variation des concentrations des composés chimiques de la plante (Fritz et al., 2001).

Les méthodes traditionnelles revues précédemment sont souvent celles qui représentent le moindre coût mais elles présentent toutefois certains désavantages. En effet, sur le terrain, il n'est jamais certain que ce soit toute la diversité du régime alimentaire qui soit observée. Les expériences en laboratoires sont souvent limitées par les connaissances a priori sur l'alimentation de l'espèce, qui sont parfois très limitées. Le manque de réalisme peut donc être un point négatif lié à cette méthode (Speiser, 2001). Dans le contexte naturel, l'animal peut avoir des comportements alimentaires qui ne seront pas retrouvés en laboratoire car le choix alimentaire va dépendre à la fois de la qualité de l'aliment et des contraintes environnementales liées à l'alimentation selon Morse (1980). Dans la nature, l'animal peut être actif seulement selon certaines conditions météorologiques, ou il peut se nourrir en fonction de l'abondance relative des espèces présentes, ou préférer des individus immatures aux adultes. Un exemple de l'influence de l'environnement sur le choix alimentaire peut être illustré par le comportement de certains amphipodes marins. Les amphipodes vont choisir de se nourrir d'une espèce d'algue qui leur offre un

abri en présence de prédateurs, même si ce n'est pas l'espèce qu'ils vont préférer en absence de prédateurs (Duffy & Hay, 1991).

Que ce soit pour les observations sur le terrain ou les expériences en laboratoire, certains animaux restent difficiles à observer comme les animaux aquatiques (Hyslop, 1980; Nielsen et al., 2018) ou à garder en captivité comme par exemple, les animaux provenant des abysses (Orejas et al., 2019).

L'un des désavantages majeurs de l'analyse visuelle des contenus digestifs ou des excréments, est qu'elle nécessite des connaissances de la part de l'observateur et l'identification taxonomique est souvent peu précise (Nielsen et al., 2018; Smith, Mcveagh, Allain, & Sanchez, 2005). Le temps de digestion peut largement varier selon les éléments ingérés ce qui va biaiser l'identification en faveur des parties moins digestes lors de l'interprétation du régime alimentaire (Pompanon et al., 2012). Tous les animaux n'ingèrent pas des éléments solides, comme certains insectes (Davidson, 1976) et arachnides (Furlong, 2015) qui liquéfient leurs proies avant de les manger. L'analyse visuelle est également limitée lorsque la quantité de matériel ingérée est faible, ce qui réduit l'information disponible sur l'alimentation comme, par exemple pour des larves (Chow et al., 2019).

Il existe d'autres techniques comme l'analyse des ratios d'isotopes stables qui dépasse les limites des méthodes traditionnelles décrites précédemment. Cette méthode permet de connaître le niveau trophique des espèces consommées grâce à la proportion d'azote stockée dans les tissus du consommateur (Katzenberg, 2007; Rubenstein & Hobson, 2004). Le ratio de carbone permet de localiser l'origine des espèces consommés par un

animal (Nielsen et al., 2018) ainsi que les variations de la consommation des espèces au cours du temps (Marcoux, McMeans, Fisk, & Ferguson, 2012). Un autre avantage de l'approche basée sur les ratios isotopes stables est qu'un unique échantillon de tissu du consommateur peut être utilisé pour caractériser le régime alimentaire sur une longue échelle temporelle allant de quelques semaines à plusieurs mois (Dalerum & Angerbjörn, 2005). Cette technique ne fournit cependant aucune identification, ni information sur la diversité des espèces consommées, à moins de récolter et d'appliquer préalablement la méthode des isotopes stables sur toutes les espèces consommées (Rubenstein & Hobson, 2004).

Les méthodes basées sur l'ADN permettent de connaître la diversité d'un échantillon de manière plus précise que les méthodes décrites précédemment. L'utilisation de PCR avec migration sur gel d'électrophorèse possiblement suivi de séquençage peut être utilisée pour identifier le régime alimentaire d'une espèce (McInnes et al., 2017) ou pour l'analyse d'ADN environnemental qui permet de détecter tous les ADN présents dans un environnement échantillonné (Roubinet et al., 2018). Premièrement, l'identification des espèces consommées est possible de manière précise, au niveau du genre ou même de l'espèce (Traugott, Thalinger, Wallinger, & Sint, 2020) grâce à la comparaison des séquences obtenues à celles de banques de données (Cuevas-Caballé, Riutort, & Álvarez-Presas, 2019) mais elle est sensible aux amorces utilisées. Deuxièmement, il est possible d'utiliser une quantité limitée d'ADN, ce qui est parfois tout ce qui est disponible, pour identifier les taxons qui ont été consommés par l'animal (Ayala et al., 2018) ou les espèces retrouvées dans le milieu grâce aux techniques basées sur l'ADN environnemental (Thalinger, Wolf, Traugott, & Wanzenböck, 2019). Finalement, comparé aux méthodes

n'utilisant pas l'ADN, un plus grand nombre d'échantillons peuvent être analysés plus rapidement et plus facilement (Roubinet et al., 2018; Zimmermann, Glöckner, Jahn, Enke, & Gemeinholzer, 2015).

Les méthodes basées sur l'ADN sont divisées en deux grandes catégories : celles qui reposent sur l'utilisation de PCR suivie d'une lecture sur gel d'électrophorèse, et celles qui se poursuivent par un séquençage d'ADN (Traugott et al., 2020). Les premières étapes suivies par chacune de ces deux catégories sont les mêmes. Premièrement l'ADN doit être amplifié par PCR avec des amorces dont le choix est crucial (Pompanon et al., 2012). Il faut s'assurer d'amplifier l'ADN de toutes les espèces consommées mais sans amplifier l'ADN de l'espèce consommatrice. En effet, il est nécessaire de choisir un segment d'ADN qui présente à la fois des extrémités très conservées, pour pouvoir cibler un segment commun à toutes les espèces consommées, mais également une partie centrale assez variable pour permettre une identification précise des différents taxons (Clarke, Soubrier, Weyrich, & Cooper, 2014). Une fois les amorces déterminées, l'utilisation de PCR avec gel d'électrophorèse permet avec peu de manipulations (extractions, amplifications, chargement sur gel) de déterminer la diversité d'un échantillon grâce aux différences de taille ou de conformation des segments d'ADN présents sur le gel (Kang, 2019). Il existe différents types de gels d'électrophorèses variant en composition et permettant plusieurs types de discrimination. Le gel d'agarose, permet une lecture rapide selon la taille de l'ADN (variation de plusieurs centaines de bases) ce qui permet par exemple de tester la présence ou non d'un taxon (Kang, 2019). Il y a aussi différents gels à base d'acrylamide, plus précis qui différencient l'ADN selon sa conformation (SSCP; Orita, Suzuki, Sekiya, & Hayashi, 1989) ou le poids moléculaire

(Urea PAGE; Summer et al., 2009). Le séquençage des variants permet ensuite d'identifier les taxons grâce à une comparaison des séquences obtenues à une base de données (GenBank, Boldsystems, etc.) pour trouver une correspondance avec une séquence déjà existante (Traugott et al., 2020). Cette étape permet d'identifier taxonomiquement les variants et de confirmer la diversité (Bruijns, Tiggelaar, & Gardeniers, 2018; Kchouk, Gibrat, & Elloumi, 2017). Le séquençage Sanger est financièrement le plus abordable et facile à exploiter car peu de bio-informatiques est nécessaire (Bruijns et al., 2018). Le séquençage SANGER permet d'obtenir la séquence nucléotidique d'un unique ADN présent par échantillon (Kchouk et al., 2017). Au fil des trois dernières décennies, l'utilisation du séquençage haut-débit dans les études écologiques de niveau trophique s'est développée (Bruijns et al., 2018) notamment pour analyser des échantillons multi-taxonomiques. Parallèlement à la complexification des échantillons, des traitements bio-informatiques complexes sont également devenus indispensables (Bruijns et al., 2018; Kchouk et al., 2017; Traugott et al., 2020). Le séquençage haut-débit permet également de détecter les proportions des espèces dans un contenu digestif ou dans un échantillon de milieu (ADNe, Zimmermann et al. 2015).

Espèces exotiques envahissantes et leurs impacts

L'évolution des techniques moléculaires appliquées à la détermination du régime alimentaire a permis une meilleure surveillance et compréhension des impacts des espèces exotiques envahissantes. Une espèce exotique est une espèce qui a été introduite hors de son aire de répartition naturelle et qui réussit à survivre, se reproduire et s'établir

sur un nouveau site (Pyšek & Richardson, 2010). Si une espèce exotique étend son aire de répartition à d'autres sites et d'autres milieux, elle deviendra alors une espèce exotique envahissante dans le milieu d'introduction (Blackburn et al., 2011). Seule une petite fraction des espèces exotiques introduites devient envahissante (Caley, Groves, & Barker, 2008) et ont des impacts considérables sur l'écosystème (Pyšek & Richardson, 2010).

Les espèces d'un écosystème local présentent entre elles des relations écologiques et évolutives; par exemple les plantes ont pu développer des mécanismes de défense contre les herbivores grâce à la coévolution (Feeny, 1992). Ainsi, si les espèces consommées et les prédateurs se maintiennent, c'est grâce à la présence d'un équilibre entre les proies et les prédateurs (Rosenzweig & MacArthur, 1963). Cependant, lorsqu'il s'agit d'espèces exotiques face à des espèces indigènes naïves, les relations peuvent devenir problématiques car les espèces indigènes ne sont pas adaptées à ces nouvelles introductions et peuvent être sans défense (Bergstrom et al., 2009). Une espèce exotique peut ajouter ou créer une pression de prédation qui n'existait pas auparavant et modifier les interactions déjà existantes.

Les espèces exotiques envahissantes sont une menace pour la survie des espèces locales et le maintien de l'écosystème (Blackburn, Bellard, & Ricciardi, 2019; Pyšek & Richardson, 2010; Robinson, 1999; Simberloff et al., 2013). Les espèces envahissantes peuvent affecter les écosystèmes de manière directe, par la consommation d'autres espèces menant à la disparition des groupes fonctionnels ainsi qu'à la perte de diversité génétique (Mooney & Cleland, 2001), ou indirectement, par la compétition ou l'introduction de pathogènes (Davis, 2003). Les espèces exotiques peuvent engendrer un

phénomène d'homogénéisation biotique (Olden, Poff, Douglas, Douglas, & Fausch, 2004) en remplaçant graduellement les espèces locales, diminuant ainsi les différences entre les régions (Beisner, Ives, & Carpenter, 2003; Olden et al., 2004). Cette homogénéisation biotique permet de faciliter l'implantation de nouvelles espèces exotiques qui renforceront le processus (García-Ramos & Rodríguez, 2002; Sessions & Kelly, 2002). D'après l'IUCN, les espèces exotiques envahissantes sont impliquées en plus d'autres facteurs dans 54% des cas d'extinctions d'espèces, et sont impliquées comme seule cause dans 20% des cas d'extinction (Clavero & García-Berthou, 2005).

Pression des gastéropodes sur le milieu

Les gastéropodes terrestres sont notamment connus pour les dommages qu'ils produisent dans les cultures (Barker, 2001). Un des exemples marquants qui a mis en lumière le caractère envahissant et dommageable de certains gastéropodes est le cas des espèces de *Pomacea sp.*, de la famille des Ampullaridae. Ces escargots d'eau douce ont causé des dommages considérables dans les rizières et les milieux humides tropicaux d'Asie (Carlsson, Brönmark, & Hansson, 2004). Importé pour la consommation humaine depuis l'Argentine jusqu'à Taiwan dans les années 1980, ces escargots ont très vite perdu l'intérêt des consommateurs et ont réussi à se propager jusqu'aux rizières (A. Martin, 1991). Les ampullaires sont phytophages, les rizières offraient donc un habitat propice à leur établissement (Carlsson et al., 2004), menant jusqu'à la perte de la majorité des récoltes (A. Martin, 1991). Selon Martin (1991), Taiwan a dépensé dès 1982 près de 1 000 000 \$ de dollars par année en molluscicides pour traiter 100 000 hectares de

rizières. Les gastéropodes peuvent aussi avoir un impact négatif sur la biodiversité. En effet, les dommages des Ampullaridae ne se sont pas cantonnés aux cultures et beaucoup de milieux humides tropicaux d'Asie ont été affectés (Hayes, Joshi, Thiengo, & Cowie, 2008). Une des espèces de *Pomacea sp.* a d'ailleurs été ajoutée dans la liste de l'IUCN des 100 espèces parmi les plus envahissantes (Lowe, Browne, Boudjelas, & De Poorter, 2000). Selon Luque et al. (2014), respectivement 9% et 17% des espèces de cette liste sont, des invertébrés aquatiques et des invertébrés terrestres. Dans cette liste de l'IUCN, on retrouve 59 animaux dont trois espèces de gastéropodes : une aquatique (*Pomacea canaliculata*) et deux terrestres (*Euglandina rosea* et *Achatina fulica*), ce qui souligne le potentiel néfaste des gastéropodes dans les écosystèmes d'introduction (Lowe et al., 2000).

Bien que certaines espèces de gastéropodes se soient fait remarquées par leur caractère envahissant et dommageable, les impacts des gastéropodes terrestres, particulièrement sur la flore indigène restent encore souvent sous-estimés (Joe & Daehler, 2008), notamment en Amérique du Nord (Moss & Hermanutz, 2010). Pourtant ils peuvent avoir des conséquences considérables et grandement affecter le taux de survie des semis dans les prairies en consommant plus de la moitié des tissus des jeunes pousses (Hulme, 1994). En exerçant une pression sur les plantes par leur alimentation, les gastéropodes peuvent changer la composition floristique des milieux en mangeant les espèces qui ont le moins de défenses ou les semis et ainsi favoriser les espèces plus résistantes (Wilby & Brown, 2001), mais aussi modifier le type de succession des forêts (Briner & Frank, 1998; Cates & Orians, 2010). Dans certains cas, les gastéropodes exotiques envahissants peuvent aussi favoriser d'autres espèces exotiques par rapport aux espèces végétales indigènes

(Joe & Daehler, 2008; Sessions & Kelly, 2002). L'étude de Sessions & Kelly (2002) a montré qu'en Nouvelle-Zélande, une espèce de gastéropode introduite a avantaé une herbacée introduite en se nourrissant d'une fougère indigène et cette herbacée apporte en plus un abri aux gastéropodes. De plus, Joe & Daehler (2008) ont mis en évidence l'impact négatif des gastéropodes introduits sur la survie des plantes indigènes qui biaise la compétition en faveur des espèces végétales introduites.

Objectifs

L'objectif principal de ce projet est de développer une technique pour déterminer le régime alimentaire des gastéropodes terrestres, qui soit accessible et reproductible, à faible coût. L'accessibilité réside dans l'emploi de matériel et de techniques à la portée de n'importe quel laboratoire afin d'envoyer le moins d'échantillons possible en soustraitance, notamment pour le séquençage.

Il est important d'identifier clairement les besoins de l'étude pour pouvoir choisir la méthode appropriée parmi toutes celles mentionnées auparavant. Ici, l'intérêt du projet porte sur le développement d'une méthode pour l'identification du régime alimentaire, en milieu naturel, d'un taxon dont le comportement alimentaire est difficile à observer. C'est le cas des gastéropodes terrestres qui sont principalement actifs la nuit (Barker, 2001) et se nourrissent principalement cachés (Speiser, 2001). Les méthodes traditionnelles sont difficiles à appliquer à ce taxon et présentent le risque de ne pas identifier toutes les espèces consommées. Pour ce qui est du choix alimentaire en laboratoire, ça ne refléterait pas l'intérêt de l'étude qui est l'alimentation des limaces en nature et ne permet pas de

représenter toute la diversité consommée (Speiser, 2001). En effet, donner un morceau de tissu de la plante n'est pas représentatif comparé à une plante dont la tige peut être protégée par des épines et ainsi plus difficile d'accès (Speiser, 2001). De plus, la visualisation des contenus digestifs ou excréments est une technique requérant des connaissances taxonomiques poussées. Cette approche n'est pas adéquate pour ce taxon car les aliments broyés une fois digérés sont peu reconnaissables, et seulement séparables en larges catégories taxonomiques (Paustian & Barbosa, 2012) et parfois certains aliments restent indétectable (Speiser, 2001). La méthode des isotopes stables ne nous permettrait pas d'établir la liste des espèces consommées, ni même la diversité. Les méthodes énoncées ne sont donc pas adaptées à cette étude.

La méthode d'analyse moléculaire basées sur l'ADN appliquée aux contenus digestifs semble être le meilleur outil car cette technique permet de capter toutes les espèces consommées en nature, d'obtenir la diversité et possiblement identifier les taxons consommés. Pour cette étude, étant donné le peu d'information disponible sur les espèces de plantes possiblement consommées par les gastéropodes terrestres, l'utilisation d'amorces universelles des plantes terrestres a été préférée. La dissection des individus a été réalisée sur l'entièreté du tractus digestif afin de capter la majorité du matériel d'ADN consommé

Le modèle biologique

En Amérique du Nord, il y a plusieurs espèces exotiques de gastéropodes terrestres : une quarantaine d'escargots et une trentaine de limaces (Nekola, 2014). Au Québec, une

dizaine d'espèces de limaces exotiques ont été recensées par Chichester et Getz (1969). Parmi celles-ci, le genre *Arion* est l'un des plus représentés en termes de nombres d'espèces et comprend le complexe d'*A. subfuscus* s.l. Ce complexe d'espèces cryptiques (Pinceel, Jordaens, Van Houtte, De Winter, & Backeljau, 2004) est retrouvé dans les habitats forestiers en Amérique du Nord et, lorsque présent, peut être très abondant (Beyer & Saari, 1978; Chichester & Getz, 1973; Fritz et al., 2001). Aux États-Unis, dans l'état de New York, le complexe d'*A. subfuscus* s. l. a été enregistré avec une abondance allant de 6,9 à 8,8 limaces/2m² (Fritz et al., 2001).

Récemment, L'Heureux et Angers (2018) ont documenté l'identité des espèces du complexe d'*A. subfuscus* s. l. et leur répartition dans le sud du Québec et ont noté une importante expansion de la répartition du complexe en un demi-siècle. *A. fuscus* est la plus abondante des espèces du complexe et est aujourd'hui présente dans tout le sud du Québec (L'Heureux & Angers, 2018), ce qui est considérable étant donné la faible capacité de dispersion active des gastéropodes terrestres (Bailey, 1989; Baur & Baur, 1990).

Même si le caractère envahissant d'une espèce ne détermine pas le fait qu'elle puisse nuire aux espèces locales (Ricciardi & Cohen, 2007), l'abondance de celle-ci est cependant fortement corrélée (Ricciardi, 2003). De plus, le peu d'information disponible sur *A. fuscus* au Québec, est un argument de plus pour la surveillance de cette espèce et pour la protection des espèces locales dans les milieux naturels où elle est retrouvée.

Des milieux d'intérêts à protéger

Les érablières anciennes du Québec sont des forêts de feuillues que le complexe d'*A. subfuscus* s. l. a réussi à exploiter (Chichester & Getz, 1973) et les limaces peuvent y être retrouvées de manière abondante (Beyer & Saari, 1978). Ces forêts peuvent abriter des espèces rares telles que des orchidées, ou d'intérêt comme l'ail des bois (*Allium tricoccum*) et le ginseng à cinq folioles (*Panax quinquefolius*) (Victorin, Rouleau, & Brouillet, 1995). Le ginseng à cinq folioles est enregistré parmi les espèces en voie de disparition au Canada (Environnement Canada, 2014) et comme espèce menacée au Québec (Gouvernement du Québec, 2012) où l'on retrouve les populations les plus septentrionales (Gouvernement du Québec, 2018). La récente expansion de l'aire de répartition d'*A. fuscus* (L'Heureux & Angers, 2018) pourrait être une menace pour ces nombreuses espèces de plantes déjà sous surveillance.

L'échantillonnage des spécimens d'*A. fuscus* nécessaires à cette étude, a été réalisé au printemps où les plantes en émergence sont le plus vulnérables aux herbivores car leurs défenses chimiques et physiques ne sont pas encore développées (Merkle et al., 2016; Rathcke, 1985). De plus, les espèces végétales de sous-bois peuvent être très affectées par le broutage; par exemple le ginseng à cinq folioles ne repoussera pas durant l'été si la partie aérienne est mangée, ça ne sera qu'au printemps suivant que la plante pourra à nouveau émerger et ces risques de mortalité seront accrus (Mooney & McGraw, 2007). De ce fait, une fois la technique testée et l'identité des espèces consommées par *A. fuscus* connue, il sera intéressant d'évaluer si cette espèce de limace exotique envahissante peut être une menace directe pour les espèces de plantes des érablières anciennes du Québec.

Article: Developing a PCR-SSCP method based on digestive content to characterize diet of gastropods.

Authors: Hinatea Arie¹, Érik L'Heureux^{1*} and Bernard Angers^{1*}.

¹ Département de sciences biologiques, Université de Montréal, Québec, Canada

* Both authors contributed equally to the supervision of the project and feature as co-last authors.

Authors contributions:

This study was elaborated by H. A. and É. L'H. with the guidance and involvement of B. A. Several collaborators were involved in the sampling under the management and coordination of É. L'H. Laboratory and analyzes were performed by H. A. and É. L'H. The article was written by H. A. under the supervision of É. L'H. and B. A.

Résumé

Déterminer le régime alimentaire des gastéropodes terrestres est important étant donné leurs impacts écologiques et économiques. L'observation en nature est difficile, car les gastéropodes sont principalement actifs la nuit et sont de petite taille. De plus, l'analyse visuelle des contenus digestifs est compliquée car les gastéropodes broient leurs aliments, ne permettant pas une identification précise. L'objectif est de produire une méthode fiable et peu onéreuse pour déterminer le régime alimentaire des gastéropodes en milieu naturel. Le modèle, *Arion fuscus*, a été échantillonné au printemps dans quatre érablières anciennes du sud du Québec (Canada). Une approche basée sur l'ADN a été utilisée avec amplification par PCR d'un segment d'un gène chloroplastique. La diversité a été déterminée par électrophorèse sur gel non-dénaturant suivie d'un séquençage des variants d'intérêts pour identifier les plantes consommées. Pour les 52 limaces analysées, les PCR ont fonctionné avec succès et les extractions d'ADN de mêmes individus traités indépendamment ont montré les mêmes résultats sur les gels SSCP. Des résultats fiables ont été produits en quelques semaines et le nombre d'échantillons à séquencer a été limité, réduisant ainsi les coûts. Les résultats montrent une faible diversité végétale consommée (6 haplotypes) par *A. fuscus*; 78,8% des limaces ont uniquement consommé la même espèce de plante. Cette méthode peut permettre de meilleurs suivis des espèces consommées par les gastéropodes dans un contexte d'écologie de la conservation ou de contrôle des espèces nuisibles.

Mots-clés : régime alimentaire, *Arion fuscus*, analyses moléculaires, Sanger, SSCP, érablière.

Abstract

The diet of terrestrial gastropods is difficult to assess in nature because of their often-nocturnal activity and their small size. Moreover, visual analyzes of digestive contents are problematic because gastropods grind food into small particles, making visual identification unexploitable. Determining the gastropods' diet is nevertheless highly relevant because gastropods may have strong ecological and economic impacts. On the one hand, several species are listed endangered or critically endangered. On the opposite, numerous species are considered agricultural pests. The objective is to produce an accurate and inexpensive method to determine the diet of gastropods. More specifically, by using an approach based on PCR-amplified DNA followed by SSCP gels, it was possible to determine taxa diversity before Sanger sequencing, and thus reduce costs. We used *Arion fuscus* from four old maple forests sites in southern Quebec (Canada) as model to test the method. The 52 individuals' digestive contents analyzed resulted in a successful PCR amplification and independent DNA extractions from a given individual gave the same SSCP pattern. This method produced reliable results in a few weeks and at a low cost, making it possible to sequence only a few samples to know the plant species consumed by all individuals in the study. Results revealed a low diversity of plants consumed (6 haplotypes). 78.8% of the slugs harvested in spring consumed one and the same species of plant. This method enables the monitoring of plant species consumed by gastropods in conservation and agricultural pest control.

Key words: Diet, *Arion fuscus*, molecular analyzes, Sanger, SSCP, maple forest.

Introduction

Determining the diet of wild organisms under natural conditions is of primary importance in many fields of biology. Understanding feeding habits is essential to evaluate trophic interactions (McCann, 2007). Such information allows the identification of species interactions and the position of a species in the food web. Thanks to trophic interactions, it is possible to understand the pressure that species exert on each other as well as niche partitioning (Kartzinel et al., 2015). Similarly, knowing the diet helps to identify potential crop pests and to elaborate pest control plans (Nboyine et al., 2019). Diet is also an important parameter in ecotoxicology. Bioaccumulation is linked to diet because toxic elements may be transferred by consumption (Penicaud et al., 2017). Knowing the diet is essential, especially during the introduction of a species in a new habitat or ecosystem, to better assess its impact and the threat it poses to vulnerable native species (Simberloff et al., 2013). It can also help the preservation of a species by promoting suitable habitats and consumed species (Stone et al., 2017).

Many approaches exist to assess the diet of organisms, each with strengths and weaknesses. Diet can be determined by direct observation in the field which also provides information about *in situ* feeding behavior (Holechek, Vavra, & Pieper, 1982; Margalida, Bertran, & Boudet, 2005). Indirect cues can also be observed such as grazing marks on plants or prey remains, while exclusion experiments can be used to limit the trophic interactions with certain herbivores or predators (Belovsky, 1984; Joe & Daehler, 2008; Preston, Jones, & Horton, 2017). Food consumed or preferred can be determined by food choice trials in controlled conditions (Petit, Boursault, & Bohan, 2014). However, some

animal species are difficult to observe over the long term or with enough observations and it is sometimes difficult, for technological or financial reasons, to have constant monitoring (Hasting & Harrison, 1994; Ims & Yoccoz, 1997). This is particularly the case for many invertebrates (Birkhofer et al., 2017), threatened or rare species (Legge et al., 2018) and also species out of reach like deep sea organisms (Weller et al., 2019).

Another way to determine diet is by analyzing ingested food through visual identification of digestive contents or feces (Hägele & Rahier, 2001; Reynolds & Aebischer, 1991).

Digestive contents and fecal matter can generally be easily collected and are representative of recent meals (Hayden et al., 2014). They, therefore, provide information on feeding preferences in terms of identity, diversity and proportion of food items ingested (Nielsen et al., 2018). This approach is not without limitations. For instance, visual identification of post-ingested remains is a time-consuming task and generally requires broad expertise in taxonomic identifications (Buckland, Baker, Loneragan, & Sheaves, 2017; Nielsen et al., 2018). Moreover, such an approach is irreconcilable with minute amount of material. That is for example the case for young stages or microscopic species (Chow et al., 2019; D. L. Martin, Ross, Quetin, & Murray, 2006) or when the material is no longer identifiable for instance, in arthropods that liquefy prey body (Furlong, 2015), or for species that feed on body fluid such as blood (Bohmann et al., 2018; Michel et al., 2018). Similarly, diet determination based on feces identification can be biased because different digestion times make diet determination inaccurate (Lake, Burton, & Van Den Hoff, 2003; Massey, Roffler, Vermeul, Allen, & Levi, 2021).

Finally, feces identification is based on the presence of hard prey parts such as bones,

exoskeleton and shell, the presence of species without such hard parts may be missed (Bowen & Iverson, 2013).

Molecular approaches overcome some of the limitations of visual identification. Stable isotopes allow the calculation of the ratio of radioactive carbon and nitrogen forms in an organism, which is dependent on the trophic level of its preys as well as their origin (Katzenberg, 2007; Sandberg, Loudon, & Sponheimer, 2012). This technique is useful because every tissue from an organism can be used, even feathers, scales or skin which could be sampled non-invasively (Marcoux et al., 2012; Quillfeldt, McGill, & Furness, 2005). Such an approach allows the long-term monitoring of diet, i.e. weeks or months (Dalerum & Angerbjörn, 2005; Tieszen, Boutton, Tesdahl, & Slade, 1983). However, this method does not allow the identification of consumed species (Rubenstein & Hobson, 2004).

DNA analyzes is an approach allowing the discrimination of the different items within digestive content or feces through PCR and electrophoresis gels, possibly followed by sequencing methods (Nielsen et al., 2018; Symondson, 2002). Every item can be identified without prior knowledge of the diet of the studied organism, by comparing the sequences obtained to public databases. Consequently, it removes the most of identification and manipulation biases (Pompanon et al., 2012). Moreover, molecular techniques allow the utilization of lower quality/quantity material. This is the case in many research contexts such as for ancient DNA (Hofreiter et al., 2000), degraded DNA, or small amounts of material (Chow et al., 2019), which is the case for digested samples.

Approaches based on DNA can be divided in two main categories: the first uses PCR and electrophoresis gels and the second follows the same steps plus DNA sequencing. DNA must be amplified through PCR with primers designed for a well-chosen DNA region (Nielsen et al., 2018; Pompanon et al., 2012). The targeted DNA region should contain enough conservation segments to target the maximum of ingested species, while also include variable segments to permit a precise identification of taxa (Clarke et al., 2014). Afterwards, results of those PCRs can be visualized on several types of electrophoresis gels to assess the diversity of the sample based on the migration of DNA segments depending on the length or conformation (Kang, 2019). Finally, the sequencing of different variants allows the identification of taxonomic units by comparing obtained sequences to those in a database such as GenBank (Traugott et al., 2020). There are different sequencing methods, and it is important to choose one that best fits the goal of the study. Sanger sequencing is the cheapest option and outputs are easily exploitable by many with minimal bioinformatic steps required (Bruijns et al., 2018) but preliminary analyzes are required. Sanger sequencing provides the nucleotide sequence of a single DNA per sample (Kchouk et al., 2017), which makes the analyzes of multi-species samples impossible. High-throughput sequencing has become increasingly used in ecological studies (Bruijns et al., 2018), notably for multi-taxa analyzes. Samples analyzed using this technique can be more complex, with DNA from different species or with minute quantities of DNA, and DNA proportions can be evaluated in digestive contents or environmental samples (Alberdi et al., 2019; Zimmermann et al., 2015). High-throughput sequencing, however, comes with much larger costs, and with extended

data processing using advanced bioinformatics (Bruijns et al., 2018; Kchouk et al., 2017; Traugott et al., 2020).

Gastropod species are good examples of organisms in which molecular identification of diet items is particularly relevant. Visual analyzes of digestive contents are problematic because gastropods grind food into small particles using their radula and their jaw (Kohn, 1983). Therefore, most of the consumed items are unrecognizable or only roughly categorizable (Paustian & Barbosa, 2012; Zamora-Silva & Malaquias, 2016), making visual identification unexploitable for precise identification of consumed species.

Consequently, the analyzes of the diet of terrestrial gastropods are usually limited to the observation of feeding damages on plants (Fritz et al., 2001; Hahn, Draney, & Dornbush, 2011) and/or laboratory palatability tests. Laboratory tests consist in starving slugs, then feeding them with a precise amount of leaves (Hahn et al., 2011; Lombardo & Cooke Dennis, 2002; Rathcke & Lacey, 1985). However, molecular analyzes are a useful tools to investigate gastropod diet (Kallevik, 2013) and this method is not used enough for this taxon.

Determining the diet of gastropod species is nevertheless crucial because many of them have strong ecological and economic impacts. Gastropods represent more than 7,000 described species (IUCN Red List, 2020). While several species (1,120) of terrestrial gastropods are listed endangered or critically endangered (IUCN Red List, 2020), numerous species have been introduced throughout the world and became invasive (Cowie & Robinson, 2003). Finally, several species (introduced as well as indigenous)

are considered agricultural pests (Barker, 2002; Cowie, Dillon, Robinson, & Smith, 2009).

The aim of this project was to develop a fast and inexpensive method to assess the diversity, as well as the identity of plants consumed by gastropod from their digestive contents through DNA analyzes. More specifically, the proposed method uses a PCR procedure to amplify a segment of the chloroplast genome, assesses diversity by single-strand conformation polymorphism (SSCP), and determines identity of the different items by Sanger sequencing.

To achieve this objective, the slug *Arion fuscus* was selected as a candidate species due to its large size (Beyer & Saari, 1978; Chichester & Getz, 1973) facilitating dissections and because it is easily found in Québec (L'Heureux & Angers, 2018). Also the *A. subfuscus* s.l. complex could be very abundant ranging from 6.9 to 8.8 slugs/2m² (Fritz et al., 2001). Species of *Arion* genus are known to be food generalists and to feed on plants from deciduous and coniferous seedlings (Nystrand & Granstrom, 1997; Rathcke, 1985), flower parts (Beyer & Saari, 1978; Jennings & Barkham, 1975) and herbaceous plants (Bruelheide & Scheidel, 1999; Rathcke, 1985). Their diet also includes fungi (Beyer & Saari, 1978; Chichester & Getz, 1973) and decaying matter (Beyer & Saari, 1978).

Material and methods

Specimen Sampling

Slugs were sampled in four deciduous forests dominated by sugar maples (*Acer saccharum*). The distance between sites ranged from 14.92 to 84.31 km. All sites were located south to St-Lawrence River, in southern Quebec (Canada). The exact site locations are kept confidential for conservation and protection reasons because maple forests are known to be important habitat for a high diversity of herbaceous including threatened species (Victorin et al., 1995).

Cardboard panels were set on the forest floor on each site, to provide shelters for slug specimens during the day, several days prior to the beginning of sampling. As slugs are more active at night (Dainton, 1954), cardboards were visited to collect sheltered individuals in the morning to reduce the time since last feeding activity as much as possible. Sites were visited twice a week for a period of 3 weeks in May 2017. 52 specimens visually identified as *A. subfuscus* s. l. complex (Chichester & Getz, 1973) were preserved in 95% ethanol as soon as they were collected to prevent further degradation of digestive content material. Preserved specimens were then genetically identified as *A. fuscus* using mitochondrial DNA 16S gene following the method described by L'Heureux and Angers (2018).

DNA extraction

Dissection of slugs was performed to remove the whole digestive tract, from end of buccal mass to anus which was preserved in 95% ethanol. Digestive content was then collected, put in ethanol, shredded with scissors, and homogenized with a vortex prior to DNA extraction to ensure a complete representation of the items consumed. Between 20 mg and 50 mg of wet shredded and homogenized digestive content per individual was dried by using a speed vacuum to quickly evaporate the ethanol. Then, material was kept on ice to prevent quality loss, until the next step. DNA was extracted and purified from dry digestive content samplings with QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit from QIAGEN (Valencia, CA, USA). Digestive content was then crushed again with a disposable pestle mounted on an electric drill in 100 µl of InhibitEX Buffer. This step was repeated five times, to a total of 600 µl of InhibitEX Buffer. Those steps were crucial to break plant cell wall to allow, in the next step, proteinase K digestion to break down DNA digestive proteins (Crowe et al., 1991). The QIAGEN protocol was followed to complete DNA extractions.

Plants taxa present in the digestive content of individuals were characterized at the chloroplast DNA level by using a segment of the *rbcL* gene by using a two-step approach. Plant species were first discriminated by the single strand conformation polymorphism method which can detect variations to the nearest nucleotide (SSCP; Orita et al., 1989), then variants were identified by sequencing.

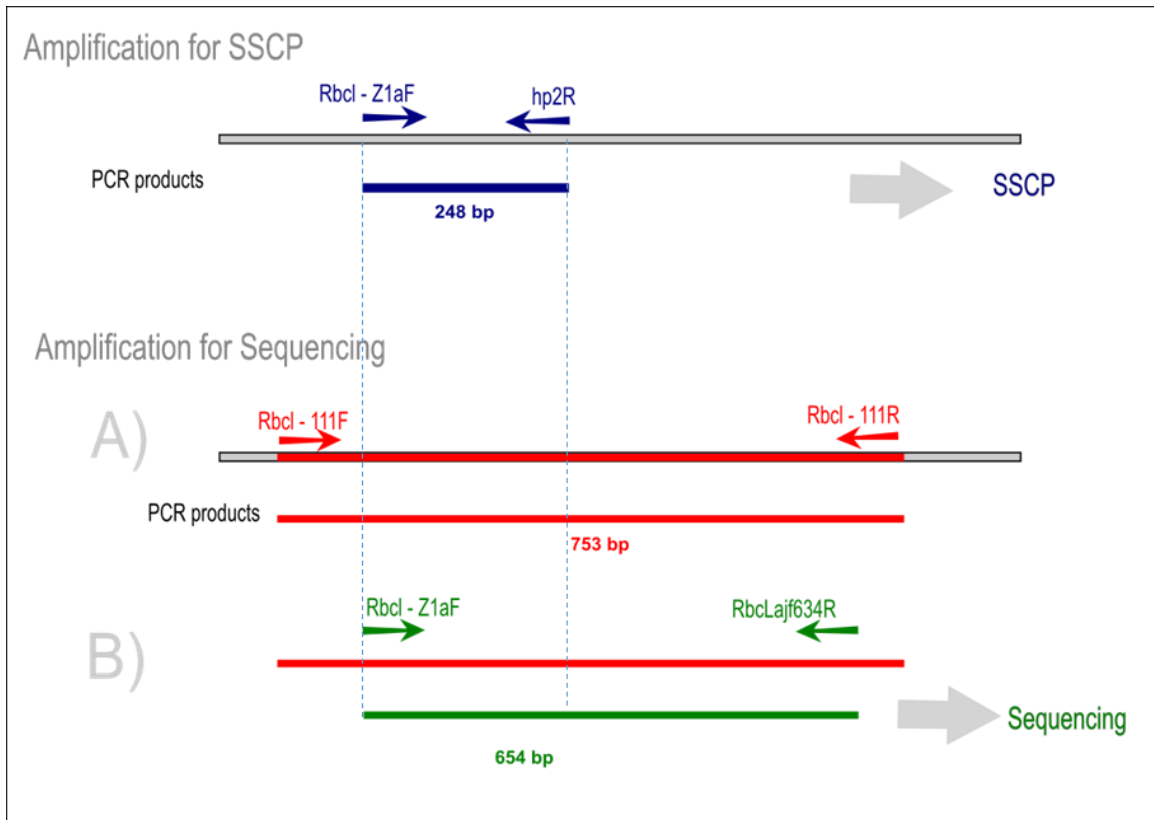


Figure 1: Schematization of PCRs. Segment length were calculated on the chloroplast DNA of the model plant *Arabidopsis thaliana* on the *rbcL* gene. Amplification for SSCP created a 248 bp fragment. Amplification for sequencing was realized in two steps. A) The first round of amplification provided a 753 bp segment used as template for the second round. B) while those for the sequencing amplification provided a 654 bp segment which includes the 245 bp of SSCP.

SSCP

For the SSCP screening, the PCR was performed with the primers rbcL-Z1aF and hp2R (**Table 1: Primers used in this study**. Segment lengths were determined according to *Arabidopsis thaliana*'s rbcL-gene.) to produce a ca. 248 bp segment in the rbcL gene (**Figure 1**). It was performed 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 DNA polymerase (Bio Basic Inc., Markham, Ontario, Canada), 1.25 μ L of 10 \times Taq polymerase buffer, and approximately 40 ng of extracted DNA. The PCR was performed with the following conditions: 92 $^{\circ}$ C for 30 s; 45 cycles of 92 $^{\circ}$ C for 10 s, 55 $^{\circ}$ C for 10 s, 68 $^{\circ}$ C for 30 s; final extension 68 $^{\circ}$ C for 2 min.

The amplified products were electrophoresed on an 8% non-denaturing polyacrylamide gel (acrylamide to bisacrylamide ratio of 37.5:1) for 10 h at 15 W at 4 $^{\circ}$ C. The SSCP conformers were then stained using silver nitrate (Benbouza, Jacquemin, Baudoin, & Mergeai, 2006).

Sequencing

A nested PCR approach in two rounds was used to increase the amount of DNA in samples used for sequencing to improve success and sequences quality. The first PCR round was performed with the primers rbcL-111F and rbcL-111R (**Table 1**) to produce a ca. 750 bp segment in rbcL gene (**Figure 1**). It was performed 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 unit of Taq DNA polymerase (Bio Basic Inc., Markham, Ontario, Canada), 1.25 μ L of 10 \times Taq polymerase

buffer, and approximately 40 ng of extracted DNA and the same PCR conditions were used as for SSCP.

The amplified products of the first round were used as template. Then, a ca. 650 bp length segment was amplified with internal primers rbcL-Z1aF and rbcLajf634R (**Table 1**). This second PCR round was performed in a volume of 25 μ L, so every reagent was doubled, to obtain enough DNA to sequence. This longer segment of the rbcL gene (that includes the SSCP segment) was amplified and sequenced to increase the specificity of plant species assignment.

Table 1: Primers used in this study. Segment lengths were determined according to *Arabidopsis thaliana*'s rbcL-gene.

| Round | Length | Primers | References |
|-------------------------------|--------|---|-----------------------------|
| PCR - SSCP | 248 pb | rbcL-Z1aF ATGTCACCACCAACAGAGACTAAAGC | (Hofreiter et al., 2000) |
| | | hp2R CGTCCTTTGTAACGATCAAG | |
| First – PCR Sequencing | 753 pb | rbcL-111F GAGTTGTAGGGAGGGACTTATG | this study |
| | | rbcL-111R CCTGCAGTAGCATTCAAGTAATG | |
| Second – PCR Sequencing | 654 pb | rbcL-Z1aF ATGTCACCACCAACAGAGACTAAAGC | (Hofreiter et al., 2000) |
| | | rbcLajf634R GAAACGGTCTCTCCAACGCAT | |

Identity of plants present in digestive contents was determined by sequencing each of the different SSCP conformers. Some of the conformers were sequenced in duplicate to assess reproducibility in the SSCP method identification.

Sanger sequencing was performed by the Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC) of the Université de Montréal (Quebec, Canada) on one strand DNA with

the primer rbcL-Z1aF. Sequences were identified by sequence-match, using Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) on GenBank (NCBI, consulted on 2nd July 2021), to identify the plant haplotype consumed by *A. fuscus*.

Results

Each of the digestive contents of the 52 individuals resulted in successful PCR amplifications. SSCP results revealed a single plant species per individual (**Figure 2**) for all individuals sampled (**Table 2: Plant haplotypes detected using SSCPs from digestive contents of the 52 specimens collected on the four sites**). Abundance of each haplotype is indicated as the number of individuals (and percentage of the sample) in which it was detected.).

Six different haplotypes were found out in digestive contents. Haplotype A was recovered from the digestive content of most of the individuals sampled (78.8%) in all four geographically distant sites (**Table 2**). The haplotype A is the only pattern identified in two sites (1 and 3). A striking result is the low plant species diversity detected within a given site (mean = 2.25; sd = 1.5) and the high similarity among the sites in haplotypes consumed.

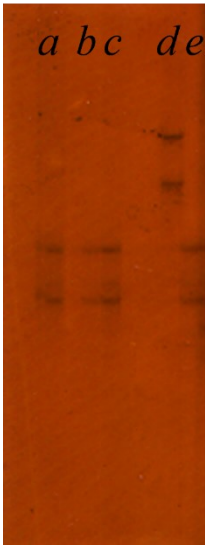


Figure 2: Example of patterns observed on a SSCP gel. Five samples are visible with two different haplotypes (patterns of samples *a*, *b*, *c* and *e* are identical and *d* is different).

Table 2: Plant haplotypes detected using SSCPs from digestive contents of the 52 specimens collected on the four sites. Abundance of each haplotype is indicated as the number of individuals (and percentage of the sample) in which it was detected.

| Site | A | B | C | D | E | F | Total |
|-------|------------|----------|----------------|----------|----------|----------|-------|
| 1 | 8* (100%) | - | - | - | - | - | 8 |
| 2 | 12 (86%) | 1 (7%) | - | - | - | 1 (7%) | 14 |
| 3 | 17 (100%) | - | - | - | - | - | 17 |
| 4 | 4 (30.8%) | - | 7** (53.8%) | 1 (7.7%) | 1 (7.7%) | - | 13 |
| Total | 41 (78.8%) | 1 (1.9%) | 7 (13.5%) | 1 (1.9%) | 1 (1.9%) | 1 (1.9%) | 52 |

*The digestive content DNA of one of them was extracted four times and each repetition gave the same results on SSCP. Repetitions are not included in the table.

** The digestive content DNA of one of them was extracted twice and each repetition gave the same results on SSCP. Repetitions are not included in the table.

Four independent DNA extractions from the digestive content of one individual from site 1 and two DNA extractions from the digestive content of one individual from site 4 were performed to assess reliability of the procedure. All extractions from a given individual gave the very same SSCP pattern.

Each SSCP variant identified was sequenced, plus one additional individual that displayed haplotype A or C due to their high abundance. A comparison of the eight

sequenced segments with the database NCBI allowed the identification of six plant taxa (Table 3).

Table 3: Identification of plant haplotypes by sequencing. For each SSCP conformer, the GenBank accession number and the taxonomic identification is given.

| Haplotype | Plant species identification | Query cover | Percent identity | GenBank |
|-----------|------------------------------|-------------|------------------|---|
| A* | <i>Fagus grandifolia</i> | 100% | 99.19% | MG248852.1 – <i>Fagus grandifolia</i> |
| B | <i>Claytonia sp.</i> | 92% | 99.65% | HQ590039.1 – <i>Claytonia caroliniana</i> ** |
| C* | <i>Osmorhiza sp.</i> | 93% | 99.83% | JF942711.1 – <i>Osmorhiza claytonii</i> ** |
| D | <i>Viola sp.</i> | 93% | 99.66% | JX664075.1 – <i>Viola pubescens</i> ** |
| E | <i>Tilia sp.</i> | 92% | 99.83% | HE963708.1 – <i>Tilia cordata</i> |
| F | <i>Hydrophyllum sp.</i> | 96% | 99.17% | KF158109.1 – <i>Hydrophyllum canadense</i> ** |

* Two individuals were sequenced for each of these haplotypes

** Several species of the same genus share the same sequence on this fragment and no other information is available to identify the species

Haplotype A, identified as *Fagus grandifolia*, represented the most commonly consumed plant species (**Table 2**). On site 4, two haplotypes (A and C) co-occurred and this is the only site where C was detected and also the only site where A was not the most abundant haplotype. Four additional haplotypes (B, D, E and F) were detected from single individuals.

Discussion

This method based on DNA and SSCP gels to discriminate diversity showed consistency among extraction replicates and SSCP controls. The six replicates from two individuals confirmed the reproducibility of the SSCP approach. We could identify the same plant species consumed across the different sites with Sanger sequencing. All plants identified are taxa listed as part of Quebec flora (Canadensys; Victorin et al., 1995) and all of them are typical of forests dominated by maple sugar trees (Victorin et al., 1995).

Primers on the conserved region of the *rbcL* gene from the chloroplast revealed a high success rate of amplification as observed in previous studies (Bell, Loeffler, & Brosi, 2017; Group et al., 2009; Hollingsworth et al., 2009). These primers amplified plant DNA without amplifying other ingested food or the slug DNA. The interest of this *rbcL* segment is universality as these specific primers target land plant species ranging from mosses to flowering plants (Fazekas et al., 2012; Pompanon et al., 2012). However, the targeted sequence could not always be used to identify taxa down the species level because of its lack of specificity, as was the case for five of the haplotypes in this study. This is an expected trade-off and limitation of *rbcL* because unlike primers for animals,

where a single gene region (COI) is capable of being both universal and specific (Hebert, Cywinska, Ball, & DeWaard, 2003), for plants it is often necessary to use a combination of primers like *rbcL* and *matK* to hit precision (Group et al., 2009). As a result, these primers gave us a decent glimpse of taxa diversity in the diet, but other primers would be needed to obtain more species identification (Group et al., 2009). This approach can also be adapted to detect other taxa like animals, fungi, etc., with specific primers design on COI or ITS regions (Hebert et al., 2003; Pompanon et al., 2012).

The use of SSCP gels to assess diversity prior to sequencing, was a good time-efficient and low-cost method for the model *A. fuscus*. Though dissection is time-consuming, the molecular approach is fast since these steps (DNA extraction, PCR amplification, SSCP gels and Sanger sequencing) can be performed in batch. Studies for which this SSCP/Sanger approach would be the most interesting are those with a low expected level of diversity. SSCP gel interpretation is based on the comparison of patterns resulting from migration of DNA segments according to their molecular conformations. Therefore, two samples showing the same SSCP gel patterns would be interpreted as having an identical DNA sequence and different patterns would have different sequences (Orita et al., 1989). Thus, the lower the diversity within digestive contents is, the easier it is to interpret the gel (**Figure 2**); a high diversity would make it hard to disentangle different patterns apart. In such cases, it could be more appropriate to analyze samples directly through amplicon sequencing to discriminate diversity within individual digestive contents via the use of high-throughput sequencing instead of Sanger method (Paul, Otte, Schmitt, & Dal Grande, 2018; Yu et al., 2012). Even if sequencing costs have decreased, it could still be a substantial expense for research groups, depending on the sampling

design (Grada & Weinbrecht, 2013; Sboner, Mu, Greenbaum, Auerbach, & Gerstein, 2011). Our approach constitutes an inexpensive way to conduct preliminary assessments of diversity, for example, prior to determining which strategy between Sanger or amplicon sequencing is the most effective. This is especially true for non-model species, and for systems presenting novel and unknown species interactions, which is often the case in biological invasions.

This method, based on DNA with diversity discrimination by SSCP and Sanger sequencing, allows diet identification of the most abundant food items of invasive species of gastropods. Their impacts on local biodiversity are often underestimated (Hahn et al., 2011; Joe & Daehler, 2008; Moss & Hermanutz, 2010). It is easy to consider direct damages by grazing, but terrestrial gastropods can also influence plant community indirectly. Grazing by terrestrial mollusks can shape the plant community structure by limiting the geographical range of some species (Bruehlheide & Scheidel, 1999) and have a major role in the decreased the recruitment of seedlings and germination behavior (Hulme, 1994; Strauss et al., 2009). In this study, plant species consumed by *A. fuscus* are not at risk of extinction or threatened (Gouvernement du Québec, 2012). However, the high abundance of *A. fuscus* (Fritz et al., 2001) may be a long-term threat to the plant community (Briner & Frank, 1998; Cates & Orians, 2010; Fritz et al., 2001).

Several *Arion* species have been introduced worldwide and are invasive (Chichester & Getz, 1973). *A. fuscus* has expanded its distribution in northeastern North America and is now commonly found throughout southern Quebec (L'Heureux & Angers, 2018). This

approach, based on DNA with SSCP discrimination, appears as a relevant first step in the future assessment of the ecological and economic issues of their successful invasion.

In our study, a single plant species was recorded per digestive tract which confirms that plants are a common food source: plant DNA was amplified from all individual digestive contents. If a low intra-individual diversity was expected, given the short distance from their daily movement (Bailey, 1989), the absence of diversity was surprising because previous studies in laboratory showed that *Arion spp.* can graze on numerous plant species during a given feeding period (Rathcke, 1985). It is possible that our results reflected the most abundant plant in the digestive tract and that items present in minute amount have been missed by our analyzes. The digestion time is an important factor to consider because some plants species can be consumed more quickly than others (Speiser, 2001). But research on the digestion time of terrestrial slugs such as Arionidae is lacking. Moreover, this parameter is linked to the model species as well as to the consumed species themselves. In the absence of this factor, it is not possible to assess the daily diet of captured individuals. That said, the high similarity between individuals does not suggest a varied diet. We do not know the real composition of items in the digestive content; however this hypothesis could be tested by amplicon sequencing, an alternative to identify the different species in the digestive content (Jusino et al., 2019; Krehenwinkel, Kennedy, Pekár, & Gillespie, 2017). As the aim of the study is not to identify the entire diet of *A. fuscus* but to develop a method applicable to terrestrial gastropods to target the main consumed plant species, amplicon sequencing has not been done in this study

Using methods based on DNA to discriminate diet has certain disadvantages, notably the lack of information on the impact on the affected species. One of the drawbacks of this technique is that it does not discriminate between plant stages or parts. It is, for example, impossible to determine if a species feeds on leaves, or reproductive parts, two options that bear different implications about the threat that the herbivorous species may pose. It is also impossible to know the amount of plant damage caused by the herbivorous species using this technique; it could be more harmful if the stem is grazed rather than the leaves. Plant stage is also impossible to know, it is more dangerous for the health of the plant population if the seedlings are grazed compared with well-developed plants, which are more resilient. A plant consumed in the early sprouting stage is more vulnerable than one eaten at a mature stage when physical and chemical defenses developed (Fritz et al., 2001; Karban & Thaler, 1999). This lack of precision may represent a limitation because the literature shows a high diversity of plant stages and parts consumed by slugs (Eskelson, Chapman, Archbold, Obrycki, & Harwood, 2011; Jennings & Barkham, 1979). However, the results provided by our approach can allow the implementation of specific protocols if the life stage or plant part consumed is important (in controlled experiments) in order to specify the damage, which was not the purpose of this study. Indeed, after identifying the species of plants grazed by gastropods, different tests could be carried out. Using common garden experiments, damages (percentage grazed) can be measured and the affected plant part as well; the preferred life stage can also be noted, giving additional information about feeding behavior. An important argument for using common garden instead of simple field observation is the ability to attribute damage to a specific species instead of any herbivore (Fritz et al., 2001).

Nevertheless, this methodology can answer questions related to diet because it is quite modifiable depending on the SSCP results. SSCP gels show the diversity of the samples, and depending on the study question, the diversity per digestive content, and the budget, the sequencing approach can be chosen. If SSCP shows a lot of diversity, sequencing method must be changed to high throughput sequencing instead of Sanger. A change in the targeted DNA fragment can be realized depending on the target species. This technique could be used to inventory hard-to-reach environments via the digestive content of easily sampled animals (Boyer et al., 2015) or to know the peak of biomass of consumed species instead of harvesting them, depending on the sequencing choice after the SSCP check (Bertram et al., 2009). Also, this tool could be used indirectly in conservation projects to monitor species. This technique could be applied in many fields, such as forestry or agriculture to identify pests when several candidates are suspected to feed on plant species of interest.

Discussion générale

Résultats de la méthode (SSCP/ Séquençage)

L'utilisation de PCR avec discrimination des haplotypes par la méthode de SSCP a montré des résultats rapides et fiables obtenus à moindres coûts. La mise en évidence de la diversité des taxons consommés avant le séquençage est toutefois le principal avantage de cette méthode car cela permet de limiter la quantité d'échantillons à séquencer. La cohérence de l'approche a pu être évaluée en comparant les différents réplicas des deux

échantillons mais aussi grâce aux identifications des plantes retrouvées sur les sites d'échantillonnages, qui correspondent aux plantes typiques des érablières anciennes du Québec (Victorin et al., 1995). La méthode utilisée a révélé les taxons de plantes les plus communément consommés par les 52 limaces, ce qui laisse supposer qu'il s'agit d'un régime alimentaire multi spécifique pour *A. fuscus*.

Cependant, les résultats ont révélé que le contenu digestif d'un individu donné ne possédait que d'une seule espèce de plante. C'est dans ce contexte de diversité faible par échantillon, que l'utilisation de gels de SSCP est pertinente. Le gel de SSCP met en évidence les différences de taille et de conformation de l'ADN (Orita et al., 1989) pour chaque taxon présent dans l'échantillon. Une faible diversité par échantillon permet facilement de comparer les patrons et donc les taxons entre eux (**Figure 2**), ce qui aurait été plus difficile avec de nombreux taxons présents dans un même échantillon.

Diversité et alimentation

Même si la diversité floristique peut être importante au mètre carré, l'absence de diversité retrouvée par contenu digestif en une nuit pourrait s'expliquer de différentes façons.

Chaque individu semble consommer une plante en une nuit tel que révélé par la prépondérance d'un seul haplotype, ce qui peut être expliqué par le faible taux de dispersion d'une limace (Bailey, 1989). En effet, Bailey (1989) a montré que les déplacements de gastéropodes terrestres enregistrés pour une vingtaine de jours varient de 6 à 10 m, mais seulement de 50 cm à 2 m pour moins de deux jours. La limace peut se nourrir dans un rayon assez restreint et se concentrer sur les espèces et individus les plus

comestibles, tels que les semis de feuillus. Une autre explication serait que la limace se nourrirait particulièrement de feuilles au sol, ce qui expliquerait une prépondérance de plantes comme le hêtre à grande feuille qui est très répandu dans les érablières anciennes du Québec. Finalement, il est difficile de tirer des conclusions générales sur le régime alimentaire d'*A. fuscus* avec 52 individus et sur une seule saison. Le printemps est assez court mais connaît une abondance de semis, un stade de vie végétal plus comestible pour les gastéropodes.

Parmi les espèces les plus communes retrouvées dans l'alimentation d'*A. fuscus* nous n'avons pas détecté la présence d'espèces à statut de protection particulier, tel que le ginseng à cinq folioles ou l'ail des bois. En effet, les espèces consommées sont des espèces plutôt communes et assez répandues (Victorin et al., 1995). D'après ces résultats, *A. fuscus* n'apparaîtrait pas comme une menace pour le maintien des espèces de plantes d'intérêts, du moins durant la période étudiée qui est une période particulièrement sensible pour les herbacées. Cependant il est possible que des espèces de plantes peu abondantes sur les sites n'aient pas été détectées et il faudrait un échantillonnage plus important pour les repérer ou un inventaire exhaustif des espèces floristiques lors de l'échantillonnage des spécimens pour cibler l'espèce d'intérêt lors du séquençage.

Étant donné l'abondance d'*A. fuscus* qui est une espèce exotique envahissante (Chichester & Getz, 1969; L'Heureux & Angers, 2018), elle pourrait impacter négativement les espèces qu'elle consomme majoritairement. En effet, *A. fuscus* pourrait affecter défavorablement le recrutement des jeunes semis pour le hêtre à grande feuille, comme il a été décrit pour d'autres espèces arborescentes par le passé (Côté, Ferron, &

Gagnon, 2005). Cette méthode moléculaire basée sur l'ADN avec l'utilisation de gels d'électrophorèses (SSCP) ne nous permet pas de déterminer quelle partie de la plante est consommée par la limace (semis, litières, feuilles, etc.). Si, comme mentionné précédemment, il s'agit de litière de feuille, dans ce cas il n'y aurait aucune incidence sur le repeuplement contrairement au cas où l'alimentation serait plutôt constituée de semis ou d'organes de reproduction tels que les fleurs et les graines. Cette étude cible les plantes mais les gastéropodes peuvent consommer d'autres taxons, tels que des champignons, du lichen, de la matière en décomposition, etc. (Chichester & Getz, 1973; Gauslaa, Holien, Ohlson, & Solhøy, 2006; Rathcke, 1985). Une forte abondance de limaces signifie une augmentation de la pression de consommation sur tout ce qui fait partie du régime alimentaire des gastéropodes terrestres. De ce fait, d'autres taxons peuvent se trouver affectés par une forte pression de consommation comme les champignons et les lichens (Gauslaa et al., 2006), dont certains sont menacés.

Cette étude a permis d'élaborer une méthode efficace pour déterminer les plantes les plus communes dans les contenus digestifs des limaces et d'acquérir les premières données sur les espèces consommées par *A. fuscus* au Québec. Cependant, il ne faut pas oublier que les Arionidae sont représentés par d'autres espèces au Québec ainsi que dans des milieux différents, par exemple la région boréale qui subit d'importants changements (Pickell, Andison, Coops, Gergel, & Marshall, 2015; Sulla-Menashe, Woodcock, & Friedl, 2018). Les limaces peuvent affecter significativement le recrutement des semis avec une consommation des graines de conifères allant jusqu'à 19% (Côté et al., 2005). Les limaces peuvent avoir d'importants effets sur l'environnement, car l'exclusion des gastéropodes dans un champs de crucifères a mené à une augmentation de 37% de la

taille des plantes alors que l'exclusion des insectes, n'a pas eu d'effets significatifs (Rees & Brown, 1992).

Améliorations et limitations

Pour obtenir plus d'informations et aller plus loin dans l'analyse, d'autres techniques qui n'ont pas été utilisées ici, peuvent être réalisées. Les résultats obtenus avec cette méthode moléculaire basée sur l'ADN couplés à la migration sur gel d'électrophorèse (SSCP) pourraient être améliorés grâce à l'utilisation de PCR nichées. Effectivement dans cette étude, les PCR nichées n'ont été réalisées que pour maximiser l'ADN envoyé au séquençage, mais elles auraient pu être utilisées dès la migration sur gel de SSCP. De cette manière, la résolution et le contraste des gels auraient été améliorés par une plus grande quantité d'ADN (Van Pelt-Verkuil, Van Belkum, & Hays, 2008). Ceci aurait peut-être pu permettre de détecter les restes de plantes consommées en moins grande quantité ou dont l'ADN est de moins bonne qualité.

Pour cette étude, les amorces étaient volontairement destinées à l'identification des espèces de plantes de manière universelle, c'est pourquoi le gène chloroplastique *rbcL* a été choisi (Pompanon et al., 2012). Par conséquent, tous les taxons de plantes n'ont pu être identifiés au niveau de l'espèce, notamment en raison de la séquence très conservée de cette partie du gène *rbcL* pour des taxons phylogénétiquement proches.

Complémentairement aux amorces utilisées, d'autres paires d'amorces situées sur différentes régions du gène *rbcL*, sur le gène *matK* ou la région intergénique *trnH-psbA* auraient permis une identification plus précise des différents taxons (Group et al., 2009).

Le séquençage des amplicons au séquençage haut-débit via le DNA métabarcoding, peut-être une amélioration de la technique (Kchouk et al., 2017; Nielsen et al., 2018; Pompanon et al., 2012). En effet, dans le cas d'échantillons avec beaucoup de diversité, l'utilisation du métabarcoding permet d'obtenir l'identification de chaque taxon sans avoir à isoler préalablement l'ADN des différentes espèces (Kchouk et al., 2017) ce qui peut être moins onéreux (Stein, Martinez, Stiles, Miller, & Zakharov, 2014). Cette technique consiste en l'ajoute d'un identifiant nommé « tag », aux différentes séquences d'ADN, ce qui permet par la suite, de pouvoir les classer et les relier à un taxon grâce à une base de données (Liu, Clarke, Baker, Jordan, & Burrige, 2020; Pompanon et al., 2012). Cette technique nécessite des procédures bio-informatiques afin de traiter les séquences, ce qui rajoute un apprentissage (Liu et al., 2020) et est plus onéreuse que le séquençage Sanger.

Cette approche basée sur l'ADN avec une première lecture de diversité via les gels de SSCP peut s'appliquer à n'importe quel taxon, à condition d'utiliser les amorces appropriées. Pour les animaux, contrairement aux plantes, le gène ribosomique COI peut être utilisé car il permet de cibler tous les animaux et il est assez spécifique pour une identification précise à l'espèce (Pompanon et al., 2012; Porter & Hajibabaei, 2018; Sultana et al., 2018; Valentini, Pompanon, & Taberlet, 2009; Vences, Nagy, Sonet, & Verheyen, 2012). Pour les champignons, la région ITS du gène ribosomal nucléaire semble être la meilleure cible (Pompanon et al., 2012). Il peut aussi y avoir des obstacles liés à la base de données de correspondance à laquelle on compare les échantillons. Selon

le fragment et le taxon utilisé, l'identification peut se faire à différents niveaux taxonomiques donc il est judicieux de choisir des régions communément retrouvées dans la littérature. Il est parfois difficile de se rendre jusqu'à l'espèce dans certains cas comme, par exemple, l'ADN ancien d'organismes n'ayant jamais été séquencés (Hofreiter et al., 2000). L'une des bases de données fréquemment utilisée et regroupant des espèces à travers le monde est GenBank (Harris, 2003). Cependant, la garantie de séquence de qualité n'est pas toujours assurée (Harris, 2003).

Applications de la méthode et débouchés

Cette méthode moléculaire basée sur l'ADN et appliquée aux gastéropodes terrestres permet d'obtenir la diversité des échantillons et l'identification des espèces présentes dans les contenus digestifs, de manière plus précise et rapide que les méthodes visuelles, ou expériences de laboratoire communément utilisées sur ce taxon. Cette méthode peut s'appliquer dans différents domaines et par son aspect modulable (changement d'amorces ou de séquençage) permet de déterminer la diversité pour un meilleur choix de séquençage.

Cette technique basée sur l'ADN, même si elle fait partie d'un outil commun et souvent utilisé pour la détermination d'un régime alimentaire (Nielsen et al., 2018; Pompanon et al., 2012), a pour intérêt d'avoir été réalisée pour les gastéropodes terrestres, un taxon souvent sous-estimé et sous-étudié. Souvent les méthodes utilisées pour caractériser le régime alimentaire des gastéropodes terrestres n'utilisent pas les techniques basées sur l'ADN et ainsi ne permettent pas une identification précise des espèces consommées. Les

domaines de l'agriculture et de la sylviculture sous-estiment souvent les gastéropodes ou autres invertébrés dans leurs combats contre les ravageurs, cette méthode par l'accessibilité en termes de coût et de temps, pourraient être un outil intéressant par l'identification claire des espèces consommées. Cette technique pourrait aussi être appliquée à d'autres organismes herbivores.

En écologie de la conservation, connaître l'alimentation d'une espèce par la méthode d'analyses moléculaires basées sur l'ADN, des contenus digestifs ou des excréments permet d'identifier certains risques associés à la prédation, au parasitisme, et à la compétition, et ainsi de mieux protéger les espèces. Par exemple, lorsque la pêche industrielle de certaines espèces d'intérêt commercial rentre en compétition avec l'alimentation piscivores, et pose problème pour le maintien d'une espèce en péril (Grémillet et al., 2018; Watling & Norse, 1998). C'est le cas notamment de l'albatros à sourcil noir (*Thalassarche melanophris*) dont les populations déclinent fortement à cause de l'industrie de la pêche qui ciblent les mêmes proies que cette espèce (McInnes et al., 2017). En connaissant l'alimentation des oiseaux à certaines périodes cruciales (i.e. nidification), l'instauration d'un quota de pêche plus bas sur les organismes consommés par les oiseaux ou des restrictions dans certaines zones maritimes pourraient réduire la compétition pour les ressources et protéger les albatros à sourcil noir (McInnes et al., 2017). Connaître le régime alimentaire peut donc avoir un impact réel en écologie de la conservation.

Bien que le but premier soit de connaître l'alimentation d'une espèce ou d'une communauté, il est également possible d'utiliser les contenus digestifs ou les excréments

d'une espèce généraliste comme une méthode d'échantillonnage (Boyer et al., 2015) et d'adapter le séquençage en fonction des besoins de l'étude. Grâce à cette approche, plusieurs limites liées à la rareté, la large répartition de certains organismes, l'accessibilité ou la difficulté d'échantillonnage des espèces ciblées disparaissent (Boyer, Cruickshank, & Wratten, 2015). De cette manière, un inventaire des espèces consommées est possible (Boyer et al., 2015); par exemple, l'alimentation du rorqual de Bryde (*Balaenoptera brydei*) a permis une estimation de la diversité du zooplancton tout au long des saisons (Carroll et al., 2019). L'investigation de l'alimentation permet de découvrir de nouvelles espèces jusqu'alors inaccessibles (Boyer et al., 2015) ou le signalement d'espèces qui jusque-là n'avaient jamais été enregistrées dans une zone géographique donnée (Valdez-Moreno, Quintal-Lizama, Gómez-Lozano, & García-Rivas, 2012). L'analyse des excréments de lions de mer en Australie a permis de mieux connaître la diversité d'une zone géographique ainsi que le suivi de celle-ci, comme le montre l'étude de Berry et al. (2017).

Les contenus digestifs et excréments peuvent aussi être exploités pour connaître le pic de biomasse de certaines espèces via la consommation de celles-ci, à la place d'échantillonner les spécimens directement (Bertram, Harfenist, & Hedd, 2009). L'étude a montré que le régime alimentaire du starique de Cassin (*Ptychoramphus aleuticus*) est représentatif du pic de biomasse des copépodes consommés dans une zone précise (Bertram et al., 2009). Les copépodes sont le lien entre le zooplancton et une importante partie des prédateurs pélagiques de la chaîne alimentaire (Möllmann, Kornilovs, Fetter, & Köster, 2005), de ce fait l'estimation de leur biomasse est une information grandement

pertinente. Encore une fois cette approche est un outil très utile dans la surveillance et l'écologie de la conservation des espèces.

Conclusion

Cette étude visait à développer une méthode moléculaire, basée sur l'ADN en couplant les approches du SSCP et du séquençage, appliquée aux gastéropodes terrestres, pour réduire les coûts et augmenter l'accessibilité pour des laboratoires à faibles moyens. Cette approche a été testée sur le modèle d'*A. fuscus*, une espèce exotique envahissante dont les impacts n'ont pas été étudiés en Amérique du Nord. La méthode s'est révélée fiable et a permis d'identifier avec succès les plantes présentes dans les contenus digestifs de spécimens échantillonnés en nature. Cette technique est un outil très utile dans un contexte de faible diversité retrouvée par échantillon, une information que les SSCP permettent de révéler rapidement et à faible coût pour décider du séquençage approprié. Si la diversité par contenu digestif était importante, alors le séquençage à haut-débit des amplicons plutôt que l'approche SSCP/séquençage Sanger est à préconiser (Kchouk et al., 2017). Plusieurs applications sont possibles dans différents champs d'expertises mais aussi de manière détournée pour échantillonner des environnements ou des espèces difficiles d'accès.

Bibliographie

Alberdi, A., Aizpurua, O., Bohmann, K., Gopalakrishnan, S., Lynggaard, C., Nielsen, M., & Gilbert, M. T. P. (2019). Promises and pitfalls of using high-throughput sequencing for diet analysis. *Molecular Ecology Resources*, *19*(2), 327–348. doi: 10.1111/1755-0998.12960

Ayala, D. J., Munk, P., Lundgreen, R. B. C., Traving, S. J., Jaspers, C., Jørgensen, T. S., ... Riemann, L. (2018). Gelatinous plankton is important in the diet of European eel (*Anguilla anguilla*) larvae in the Sargasso Sea. *Scientific Reports*, *8*(1), 1–10. doi: 10.1038/s41598-018-24388-x

Bailey, S. E. R. (1989). Foraging behaviour of terrestrial gastropods: Integrating field and laboratory studies. *Journal of Molluscan Studies*, *55*(2), 263–272. doi: 10.1093/mollus/55.2.263

Barker, G. M. (2001). Gastropods on land: phylogeny, diversity and adaptive morphology. In *The biology of terrestrial molluscs* (pp. 1–146). doi: 10.1079/9780851993188.0001

Barker, G. M. (2002). Gastropods as pests in New Zealand pastoral agriculture, with emphasis on Agriolimacidae, Arionidae and Milacidae. In *Molluscs as Crop Pests* (pp. 361–423). CABI Publishing, Wallingford.

Baur, A., & Baur, B. (1990). Are roads barriers to dispersal in the land snail *Arianta arbustorum*? *Canadian Journal of Zoology*, *68*(3), 613–617. doi: 10.1139/z90-091

Beisner, B. E., Ives, A. R., & Carpenter, S. R. (2003). The effects of an exotic fish

invasion on the prey communities of two lakes. *Journal of Animal Ecology*, 72(2), 331–342. doi: 10.1046/j.1365-2656.2003.00699.x

Bell, K. L., Loeffler, V. M., & Brosi, B. J. (2017). An rbcL Reference Library to Aid in the Identification of Plant Species Mixtures by DNA Metabarcoding . *Applications in Plant Sciences*, 5(3), 1600110. doi: 10.3732/apps.1600110

Belovsky, G. E. (1984). Summer Diet Optimization by Beaver. *The American Midland Naturalist*, 111(2), 209–222.

Benbouza, H., Jacquemin, J. M., Baudoin, J. P., & Mergeai, G. (2006). Optimization of a reliable, Fast, Cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamidegels. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 10(2), 77–81.

Bergstrom, D. M., Lucieer, A., Kiefer, K., Wasley, J., Belbin, L., Pedersen, T. K., & Chown, S. L. (2009). Indirect effects of invasive species removal devastate World Heritage Island. *Journal of Applied Ecology*, 46(1), 73–81. doi: 10.1111/j.1365-2664.2008.01601.x

Berner, D., Blanckenhorn, W. U., & Körner, C. (2005). Grasshoppers cope with low host plant quality by compensatory feeding and food selection: N limitation challenged. *Oikos*, 111(3), 525–533. doi: 10.1111/j.1600-0706.2005.14144.x

Berry, T. E., Osterrieder, S. K., Murray, D. C., Coghlan, M. L., Richardson, A. J., Grealy, A. K., ... Bunce, M. (2017). DNA metabarcoding for diet analysis and biodiversity: A case study using the endangered Australian sea lion (*Neophoca cinerea*). *Ecology*

and Evolution, 7(14), 5435–5453. doi: 10.1002/ece3.3123

Bertram, D. F., Harfenist, A., & Hedd, A. (2009). Seabird nestling diets reflect latitudinal temperature-dependent variation in availability of key zooplankton prey populations.

Marine Ecology Progress Series, 393, 199–210. doi: 10.3354/meps08223

Beyer, W. N., & Saari, D. M. (1978). Activity subfuscus and Ecological (Draparnaud)

Distribution of the (Stylommatophora, Slug, Arion Arionidae). *American Midland Naturalist*, 100(2), 359–367.

Birkhofer, K., Bylund, H., Dalin, P., Ferlian, O., Gagic, V., Hambäck, P. A., ... Jonsson,

M. (2017). Methods to identify the prey of invertebrate predators in terrestrial field studies. *Ecology and Evolution*, 7(6), 1942–1953. doi: 10.1002/ece3.2791

Blackburn, T. M., Bellard, C., & Ricciardi, A. (2019). Alien versus native species as

drivers of recent extinctions. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 17(4), 203–207. doi: 10.1002/fee.2020

Blackburn, T. M., Pyšek, P., Bacher, S., Carlton, J. T., Duncan, R. P., Jarošík, V., ...

Richardson, D. M. (2011). A proposed unified framework for biological invasions. *Trends in Ecology and Evolution*, 26(7), 333–339. doi: 10.1016/j.tree.2011.03.023

Bohmann, K., Gopalakrishnan, S., Nielsen, M., Nielsen, L. dos S. B., Jones, G., Streicker,

D. G., & Gilbert, M. T. P. (2018). Using DNA metabarcoding for simultaneous inference of common vampire bat diet and population structure. *Molecular Ecology Resources*, 18(5), 1050–1063. doi: 10.1111/1755-0998.12891

Bowen, W. D., & Iverson, S. J. (2013). Methods of estimating marine mammal diets: A

- review of validation experiments and sources of bias and uncertainty. *Marine Mammal Science*, 29(4), 719–754. doi: 10.1111/j.1748-7692.2012.00604.x
- Boyer, S., Cruickshank, R. H., & Wratten, S. D. (2015). Faeces of generalist predators as “biodiversity capsules”: A new tool for biodiversity assessment in remote and inaccessible habitats. *Food Webs*, 3, 1–6. doi: 10.1016/j.fooweb.2015.02.001
- Briner, T., & Frank, T. (1998). The palatability of 78 wildflower strip plants to the slug *Arion lusitanicus*. *Annals of Applied Biology*, 133(1), 123–133. doi: 10.1111/j.1744-7348.1998.tb05808.x
- Bruelheide, H., & Scheidel, U. (1999). Slug herbivory as a limiting factor for the geographical range of *Arnica montana*. *Journal of Ecology*, 87(5), 839–848. doi: 10.1046/j.1365-2745.1999.00403.x
- Bruijns, B., Tiggelaar, R., & Gardeniers, H. (2018). Massively parallel sequencing techniques for forensics: A review. *Electrophoresis*, 39(21), 2642–2654. doi: 10.1002/elps.201800082
- Buckland, A., Baker, R., Loneragan, N., & Sheaves, M. (2017). Standardising fish stomach content analysis: The importance of prey condition. *Fisheries Research*, 196(May), 126–140. doi: 10.1016/j.fishres.2017.08.003
- Caley, P., Groves, R. H., & Barker, R. (2008). Estimating the invasion success of introduced plants. *Diversity and Distributions*, 14(2), 196–203. doi: 10.1111/j.1472-4642.2007.00440.x
- Carlsson, N. O. L., Brönmark, C., & Hansson, L. A. (2004). Invading herbivory: The

golden apple snail alters ecosystem functioning in Asian wetlands. *Ecology*, 85(6), 1575–1580. doi: 10.1890/03-3146

Carroll, E. L., Gallego, R., Sewell, M. A., Zeldis, J., Ranjard, L., Ross, H. A., ...

Constantine, R. (2019). Multi-locus DNA metabarcoding of zooplankton communities and scat reveal trophic interactions of a generalist predator. *Scientific Reports*, 9(1), 1–14. doi: 10.1038/s41598-018-36478-x

Cates, R. G., & Orians, G. H. (2010). Successional Status and the Palatability of Plants to Generalized Herbivores. *Ecological Society of America*, 56(2), 410–418.

Chichester, L. F., & Getz, L. F. (1973). The terrestrial slugs of northeastern North America. *Sterkiana*, 51(51), 11–41.

Chichester, L. F., & Getz, L. L. (1969). The zoogeography and ecology of arionid and limacid slugs introduced into northeastern North America. *Malacologia*, 7(2–3), 313–346.

Chow, S., Inaba, N., Nagai, S., Kurogi, H., Nakamura, Y., Yanagimoto, T., ... Kodama, T. (2019). Molecular diet analysis of Anguilliformes leptocephalus larvae collected in the western North Pacific. *PLoS ONE*, 14(11), 1–15. doi: 10.1371/journal.pone.0225610

Clarke, L. J., Soubrier, J., Weyrich, L. S., & Cooper, A. (2014). Environmental metabarcodes for insects: In silico PCR reveals potential for taxonomic bias. *Molecular Ecology Resources*, 14(6), 1160–1170. doi: 10.1111/1755-0998.12265

Clavero, M., & García-Berthou, E. (2005). Invasive species are a leading cause of animal

extinctions. *Trends in Ecology and Evolution*, 20(3), 110. doi:
10.1016/j.tree.2005.01.003

Côté, M., Ferron, J., & Gagnon, R. (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. doi: 10.1139/x05-001

Cowie, R. H., & Robinson, D. G. (2003). Pathways of introduction of nonindigenous land and freshwater snails and slugs. In G. M. Ruiz & J. T. Carlton (Eds.), *Invasive species: vectors and management strategies* (pp. 93-122.). Island Press.

Cowie, Robert H., Dillon, R. T., Robinson, D. G., & Smith, J. W. (2009). Alien non-marine snails and slugs of priority quarantine importance in the United States: A preliminary risk assessment. *American Malacological Bulletin*, 27(1–2), 113–132. doi: 10.4003/006.027.0210

Crowe, J. S., Cooper, H. J., Smith, M. A., Sims, M. J., Parker, D., & Gewert, D. (1991). Improved cloning efficiency of polymerase chain reaction (PCR) products after proteinase k digestion. *Nucleic Acids Research*, 19(1), 184. doi:
10.1093/nar/19.1.184

Cuevas-Caballé, C., Riutort, M., & Álvarez-Presas, M. (2019). Diet assessment of two land planarian species using high-throughput sequencing data. *Scientific Reports*, 9(1), 1–14. doi: 10.1038/s41598-019-44952-3

Dalerum, F., & Angerbjörn, A. (2005). Resolving temporal variation in vertebrate diets

using naturally occurring stable isotopes. *Oecologia*, 144(4), 647–658. doi:
10.1007/s00442-005-0118-0

Davidson, A. D. H. (1976). International Association for Ecology Assimilation
Efficiencies of Slugs on Different Food Materials. *Oecologia*, 26(3), 267–273.

Davis, M. A. (2003). Biotic globalization: Does competition from introduced species
threaten biodiversity? *BioScience*, 53(5), 481–489. doi: 10.1641/0006-
3568(2003)053[0481:BGDCFI]2.0.CO;2

Duffy, J. E., & Hay, M. E. (1991). Food and shelter as determinants of food choice by an
herbivorous marine amphipod. *Ecology*, 72(4), 1286–1298. doi: 10.2307/1941102

Environnement Canada. (2014). Ginseng à cinq folioles (*Panax quinquefolius*). Retrieved
from https://www.canada.ca/content/dam/eccc/migration/main/cites/9e21fdbf-3f22-4caa-9417-c656c9dbedab/1366_american-20ginseng_06_f_web.pdf

Eskelson, M. J., Chapman, E. G., Archbold, D. D., Obrycki, J. J., & Harwood, J. D.
(2011). Molecular identification of predation by carabid beetles on exotic and native
slugs in a strawberry agroecosystem. *Biological Control*, 56(3), 245–253. doi:
10.1016/j.biocontrol.2010.11.004

Fazekas, A. J., Kuzmina, M. L., Newmaster, S. G., & Hollingsworth, P. M. (2012). DNA
Barcoding Methods for Land Plants. In W. John Kress and David L. Erickson (Ed.),
DNA Barcodes: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology (vol. 858,
pp. 223–252). doi: 10.1007/978-1-61779-591-6_11

Feeny, P. (1992). The Evolution of Chemical Ecology: Contributions from the Study of

Herbivorous Insects. In *The evolution of chemical ecology: contributions from the study of herbivorous insects. Herbivores: Their Interactions With Secondary Plant Metabolites*. (Second Edi, pp. 1–44).

- Fritz, R. S., Hochwender, C. G., Lewkiewicz, D. A., Bothwell, S., & Orians, C. M. (2001). Seedling herbivory by slugs in a willow hybrid system: Developmental changes in damage, chemical defense, and plant performance. *Oecologia*, *129*(1), 87–97. doi: 10.1007/s004420100703
- Furlong, M. J. (2015). Knowing your enemies: Integrating molecular and ecological methods to assess the impact of arthropod predators on crop pests. *Insect Science*, *22*(1), 6–19. doi: 10.1111/1744-7917.12157
- García-Ramos, G., & Rodríguez, D. (2002). Evolutionary Speed of Species Invasions. *Evolution*, *56*(4), 661. doi: 10.1554/0014-3820(2002)056[0661:esosi]2.0.co;2
- Gauslaa, Y., Holien, H., Ohlson, M., & Solhøy, T. (2006). Does snail grazing affect growth of the old forest lichen *Lobaria pulmonaria*? *Lichenologist*, *38*(6), 587–593. doi: 10.1017/S0024282906006025
- Giovanni, M. D., Boal, C. W., & Whitlaw, H. A. (2007). Prey use and provisioning rates of breeding Ferruginous and Swainson’s Hawks on the southern Great Plains, USA. *Wilson Journal of Ornithology*, *119*(4), 558–569. doi: 10.1676/06-118.1
- Good, T. P. (1992). Experimental assessment of gull predation on the Jonah crab *Cancer borealis* (Stimpson) in New England rocky intertidal and shallow subtidal zones. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, *157*(2), 275–284. doi:

10.1016/0022-0981(92)90167-9

Gouvernement du Québec. (2012). Liste des plantes vasculaires menacées (57 espèces).

Retrieved from

<http://www.environnement.gouv.qc.ca/biodiversite/especes/listes/menacees-floristiques.pdf>

Gouvernement du Québec. (2018). Espèces menacées ou vulnérables au Québec.

Retrieved from <http://www.mddelcc.gouv.qc.ca/biodiversite/especes/>

Grada, A., & Weinbrecht, K. (2013). Next-generation sequencing: Methodology and application. *Journal of Investigative Dermatology*, 133(8), e11-4. doi:

10.1038/jid.2013.248

Grémillet, D., Ponchon, A., Paleczny, M., Palomares, M. L. D., Karpouzi, V., & Pauly, D. (2018). Persisting Worldwide Seabird-Fishery Competition Despite Seabird Community Decline. *Current Biology*, 28(24), 4009-4013.e2. doi:

10.1016/j.cub.2018.10.051

Group, C. P. W., Hollingsworth, P. M., Forrest, L. L., Spouge, J. L., Hajibabaei, M.

Ratnasingham, S., ..., & Little, D. P. (2009). A DNA barcode for land plants.

Proceedings of the National Academy of Sciences, 106(31), 12794–12797.

Hägele, B. F., & Rahier, M. (2001). Determinants of seasonal feeding of the generalist snail *Arianta arbustorum* at six sites dominated by Senecioneae. *Oecologia*, 128(2),

228–236. doi: 10.1007/s004420100644

Hahn, P. G., Draney, M. L., & Dornbush, M. E. (2011). Exotic Slugs Pose a Previously

Unrecognized Threat to the Herbaceous Layer in a Midwestern Woodland.

Restoration Ecology, 19(6), 786–794. doi: 10.1111/j.1526-100X.2010.00710.x

Hall, L. A., Woo, I., Marvin-DiPasquale, M., Tsao, D. C., Krabbenhoft, D. P., Takekawa, J. Y., & De La Cruz, S. E. W. (2020). Disentangling the effects of habitat biogeochemistry, food web structure, and diet composition on mercury bioaccumulation in a wetland bird. *Environmental Pollution*, 256, 113280. doi: 10.1016/j.envpol.2019.113280

Harris, D. J. (2003). Can you bank on GenBank? *Trends in Ecology & Evolution*, 18(7), 317–319.

Hasting, A., & Harrison, S. (1994). Metapopulation Dynamics and Genetics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 25, 167–188.

Hayden, B., Harrod, C., & Kahilainen, K. K. (2014). Dual fuels: Intra-annual variation in the relative importance of benthic and pelagic resources to maintenance, growth and reproduction in a generalist salmonid fish. *Journal of Animal Ecology*, 83(6), 1501–1512. doi: 10.1111/1365-2656.12233

Hayes, K. A., Joshi, R. C., Thiengo, S. C., & Cowie, R. H. (2008). Out of South America: Multiple origins of non-native apple snails in Asia. In *Diversity and Distributions* (Vol. 14, pp. 701–712). doi: 10.1111/j.1472-4642.2008.00483.x

Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., & DeWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270(1512), 313–321. doi: 10.1098/rspb.2002.2218

- Hofreiter, M., Poinar, H. N., Spaulding, W. G., Bauer, K., Martin, P. S., Possnert, G., & Pääbo, S. (2000). A molecular analysis of ground sloth diet through the last glaciation. *Molecular Ecology*, 9(12), 1975–1984. doi: 10.1046/j.1365-294X.2000.01106.x
- Holechek, J. L., Vavra, M., & Pieper, R. D. (1982). Botanical Composition Determination of Range Herbivore Diets: A Review. *Journal of Range Management*, 35(3), 309. doi: 10.2307/3898308
- Hollingsworth, M. L., Andra Clark, A., Forrest, L. L., Richardson, J., Pennington, R. T., Long, D. G., ... Hollingsworth, P. M. (2009). Selecting barcoding loci for plants: Evaluation of seven candidate loci with species-level sampling in three divergent groups of land plants. *Molecular Ecology Resources*, 9(2), 439–457. doi: 10.1111/j.1755-0998.2008.02439.x
- Hulme, P. E. (1994). Seedling Herbivory in Grassland: Relative Impact of Vertebrate and Invertebrate Herbivores. *The Journal of Ecology*, 82(4), 873. doi: 10.2307/2261451
- Ims, R. A., & Yoccoz, N. G. (1997). Studying Transfer Processes in Metapopulations. *Metapopulation Biology*, 247–265. doi: 10.1016/b978-012323445-2/50015-8
- IUCN Red List. (2020). The IUCN Red List of threatened species. Retrieved from <https://www.iucnredlist.org/search>
- Jennings, T. J., & Barkham, J. P. (1975). Food of Slugs in Mixed Deciduous Woodland. *Oikos*, 26(2), 211–221.
- Jennings, T. J., & Barkham, J. P. (1979). Litter Decomposition by Slugs in Mixed

Deciduous Woodland. *Holarct. Ecol.*, 2(1), 21–29.

Joe, S. M., & Daehler, C. C. (2008). Invasive slugs as under-appreciated obstacles to rare plant restoration: Evidence from the Hawaiian Islands. *Biological Invasions*, 10(2), 245–255. doi: 10.1007/s10530-007-9126-9

Jusino, M. A., Banik, M. T., Palmer, J. M., Wray, A. K., Xiao, L., Pelton, E., ... Lindner, D. L. (2019). An improved method for utilizing high-throughput amplicon sequencing to determine the diets of insectivorous animals. *Molecular Ecology Resources*, 19(1), 176–190. doi: 10.1111/1755-0998.12951

Kallevik, I. H. F. (2013). *Alternative prey choice in the pteropod Clione limacina (Gastropoda) studied by DNA-based methods* (Vol. 3950). MS thesis. UiT Norges arktiske universitet.

Kang, T. S. (2019). Development of four PCR-based methods to differentiate tilefish species (*Branchiostegus japonicus* and *B. albus*). *Food Chemistry*, 271, 1–8. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.07.138

Karban, R., & Thaler, J. S. (1999). Plant phase change and resistance to herbivory. *Ecology*, 80(2), 510–517. doi: 10.1890/0012-9658(1999)080[0510:PPCART]2.0.CO;2

Kartzinel, T. R., Chen, P. A., Coverdale, T. C., Erickson, D. L., Kress, W. J., Kuzmina, M. L., ... Pringle, R. M. (2015). DNA metabarcoding illuminates dietary niche partitioning by African large herbivores. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(26), 8019–8024. doi:

10.1073/pnas.1503283112

- Katzenberg, M. A. (2007). Stable Isotope Analysis: A Tool for Studying Past Diet, Demography, and Life History. *Biological Anthropology of the Human Skeleton: Second Edition*, 411–441. doi: 10.1002/9780470245842.ch13
- Kchouk, M., Gibrat, J. F., & Elloumi, M. (2017). Generations of Sequencing Technologies: From First to Next Generation. *Biology and Medicine*, 09(03). doi: 10.4172/0974-8369.1000395
- Kohn, A. J. (1983). Feeding biology of gastropods. In *The mollusca physiology, (Part 2)* (pp. 19–48).
- Krehenwinkel, H., Kennedy, S., Pekár, S., & Gillespie, R. G. (2017). A cost-efficient and simple protocol to enrich prey DNA from extractions of predatory arthropods for large-scale gut content analysis by Illumina sequencing. *Methods in Ecology and Evolution*, 8(1), 126–134. doi: 10.1111/2041-210X.12647
- L'Heureux, É., & Angers, B. (2018). A discreet invasion: Distribution, origins, and expansion of the European slug complex *Arion subfuscus* s.l. in Quebec. *Canadian Journal of Zoology*, 96(4), 325–331. doi: 10.1139/cjz-2017-0171
- Lake, S., Burton, H., & Van Den Hoff, J. (2003). Regional, temporal and fine-scale spatial variation in Weddell seal diet at four coastal locations in east Antarctica. *Marine Ecology Progress Series*, 254, 293–305. doi: 10.3354/meps254293
- Legge, S., Woinarski, J. C. Z., Burbidge, A. A., Palmer, R., Ringma, J., Radford, J. Q., ... Tuft, K. (2018). Havens for threatened Australian mammals: The contributions of

fenced areas and offshore islands to the protection of mammal species susceptible to introduced predators. *Wildlife Research*, 45(7), 627–644. doi: 10.1071/WR17172

Liu, M., Clarke, L. J., Baker, S. C., Jordan, G. J., & BurrIDGE, C. P. (2020). A practical guide to DNA metabarcoding for entomological ecologists. *Ecological Entomology*, 45(3), 373–385. doi: 10.1111/een.12831

Lombardo, P., & Cooke Dennis, D. D. (2002). Consumption and preference of selected food types by two freshwater gastropod species. *Archiv Fur Hydrobiologie*, 155(4), 667–685. doi: 10.1127/archiv-hydrobiol/155/2002/667

Lowe, S., Browne, M., Boudjelas, S., & De Poorter, M. (2000). 100 of the world's worst invasive alien species: a selection from the global invasive species database. *The Invasive Species Specialist Group (ISSG) a Specialist Group of the Species Survival Commission (SSC) of the World Conservation Union (IUCN), Vol. 12*(Auckland: Invasive Species Specialist Group.), 105–110.

Luque, G. M., Bellard, C., Bertelsmeier, C., Bonnaud, E., Genovesi, P., Simberloff, D., & Courchamp, F. (2014). The 100th of the world's worst invasive alien species. *Biological Invasions*, 16(5), 981–985. doi: 10.1007/s10530-013-0561-5

Marcoux, M., McMeans, B. C., Fisk, A. T., & Ferguson, S. H. (2012). Composition and temporal variation in the diet of beluga whales, derived from stable isotopes. *Marine Ecology Progress Series*, 471, 283–291. doi: 10.3354/meps10029

Margalida, A., Bertran, J., & Boudet, J. (2005). Assessing the diet of nestling Bearded Vultures: a comparison between direct observation methods. *Journal of Field*

Ornithology, 76(1), 40–45. doi: 10.1648/0273-8570-76.1.40

Martin, A. (1991). Molluscs as agricultural pests. *Outlook on Agriculture*, 20(3), 167–174. doi: 10.1177/003072709102000307

Martin, D. L., Ross, R. M., Quetin, L. B., & Murray, A. E. (2006). Molecular approach (PCR-DGGE) to diet analysis in young Antarctic krill *Euphausia superba*. *Marine Ecology Progress Series*, 319, 155–165. doi: 10.3354/meps319155

Massey, A. L., Roffler, G. H., Vermeul, T., Allen, J. M., & Levi, T. (2021). Comparison of mechanical sorting and DNA metabarcoding for diet analysis with fresh and degraded wolf scats. *Ecosphere*, 12(6). doi: 10.1002/ecs2.3557

McCann, K. (2007). Protecting biostructure. *Nature*, 446(7131), 29. doi: 10.1038/446029a

McInnes, J. C., Alderman, R., Deagle, B. E., Lea, M. A., Raymond, B., & Jarman, S. N. (2017). Optimised scat collection protocols for dietary DNA metabarcoding in vertebrates. *Methods in Ecology and Evolution*, 8(2), 192–202. doi: 10.1111/2041-210X.12677

Merkle, J. A., Monteith, K. L., Aikens, E. O., Hayes, M. M., Hersey, K. R., Middleton, A. D., ... Kauffman, M. J. (2016). Large herbivores surf waves of green-up during spring. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 283(1833), 1–8. doi: 10.1098/rspb.2016.0456

Michel, A. J., Ward, L. M., Goffredi, S. K., Dawson, K. S., Baldassarre, D. T., Brenner, A., ... Chaves, J. A. (2018). The gut of the finch: Uniqueness of the gut microbiome

of the Galápagos vampire finch 06 Biological Sciences 0602 Ecology 05
Environmental Sciences 0502 Environmental Science and Management.

Microbiome, 6(1), 7–9. doi: 10.1186/s40168-018-0555-8

Möllmann, C., Kornilovs, G., Fetter, M., & Köster, F. W. (2005). Climate, zooplankton, and pelagic fish growth in the central Baltic Sea. *ICES Journal of Marine Science*, 62(7), 1270–1280. doi: 10.1016/j.icesjms.2005.04.021

Mooney, E. H., & McGraw, J. B. (2007). Effects of self-pollination and outcrossing with cultivated plants in small natural populations of american ginseng, *Panax quinquefolius* (Araliaceae). *American Journal of Botany*, 94(10), 1677–1687. doi: 10.3732/ajb.94.10.1677

Mooney, H. A., & Cleland, E. E. (2001). The evolutionary impact of invasive species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(10), 5446–5451. doi: 10.1073/pnas.091093398

Morrison, W. E., & Hay, M. E. (2011). Herbivore preference for native vs. exotic plants: Generalist herbivores from multiple continents prefer exotic plants that are evolutionarily Naïve. *PLoS ONE*, 6(3). doi: 10.1371/journal.pone.0017227

Morse, D. H. (1980). *Behavioral Mechanisms in Ecology (pp59-88)*. Harvard University Press.

Moss, M., & Hermanutz, L. (2010). Monitoring the small and slimy - Protected areas should be monitoring native and non-native slugs (Mollusca: Gastropoda). *Natural Areas Journal*, 30(3), 322–327. doi: 10.3375/043.030.0307

- Nboyine, J. A., Boyer, S., Saville, D. J., & Wratten, S. D. (2019). Identifying plant DNA in the faeces of a generalist insect pest to inform trap cropping strategy. *Agronomy for Sustainable Development*, 39(6). doi: 10.1007/s13593-019-0603-1
- Nekola, J. C. (2014). Overview of the North American Terrestrial Gastropod Fauna. *American Malacological Bulletin*, 32(2), 225–235. doi: 10.4003/006.032.0203
- Nielsen, J. M., Clare, E. L., Hayden, B., Brett, M. T., & Kratina, P. (2018). Diet tracing in ecology: Method comparison and selection. *Methods in Ecology and Evolution*, 9(2), 278–291. doi: 10.1111/2041-210X.12869
- Nystrand, O., & Granstrom, A. (1997). Forest floor moisture controls predator activity on juvenile seedlings of *Pinus sylvestris*. *Canadian Journal of Forest Research*, 27(11), 1746–1752. doi: 10.1139/x97-148
- Olden, J. D., Poff, N. L. R., Douglas, M. R., Douglas, M. E., & Fausch, K. D. (2004). Ecological and evolutionary consequences of biotic homogenization. *Trends in Ecology and Evolution*, 19(1), 18–24. doi: 10.1016/j.tree.2003.09.010
- Orejas, C., Taviani, M., Ambroso, S., Andreou, V., Bilan, M., Bo, M., ... Carreiro-silva, M. (2019). 38 Cold-Water Coral in Aquaria: Advances and Challenges. A Focus on the Mediterranean. Mediterranean cold-water corals: past, present and future. In *Mediterranean Cold-Water Corals: Past, Present and Future* (pp. 435–471). Springer, Cham. doi: https://doi.org/10.1007/978-3-319-91608-8_38
- Orita, M., Suzuki, Y., Sekiya, T., & Hayashi, K. (1989). Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction.

Genomics, 5(4), 874–879. doi: 10.1016/0888-7543(89)90129-8

Paul, F., Otte, J., Schmitt, I., & Dal Grande, F. (2018). Comparing Sanger sequencing and high-throughput metabarcoding for inferring photobiont diversity in lichens.

Scientific Reports, 8(1), 1–7. doi: 10.1038/s41598-018-26947-8

Paustian, M. E., & Barbosa, P. (2012). Overlap of food and microhabitat preferences among some native and nonnative slugs in mid-Atlantic forests of eastern North

America. *Journal of Molluscan Studies*, 78(1), 92–99. doi: 10.1093/mollus/eyr041

Penicaud, V., Lacoue-Labarthe, T., & Bustamante, P. (2017). Metal bioaccumulation and detoxification processes in cephalopods: A review. *Environmental Research*,

155(February), 123–133. doi: 10.1016/j.envres.2017.02.003

Petit, S., Boursault, A., & Bohan, D. A. (2014). Weed seed choice by carabid beetles (Coleoptera: Carabidae): Linking field measurements with laboratory diet

assessments. *European Journal of Entomology*, 111(5), 615–620. doi:

10.14411/eje.2014.086

Pickell, P. D., Andison, D. W., Coops, N. C., Gergel, S. E., & Marshall, P. L. (2015). The spatial patterns of anthropogenic disturbance in the western canadian boreal forest

following oil and gas development. *Canadian Journal of Forest Research*, 45(6),

732–743. doi: 10.1139/cjfr-2014-0546

Pinceel, J., Jordaens, K., Van Houtte, N., De Winter, A. J., & Backeljau, T. (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(1), 23–38. doi: 10.1111/j.1095-8312.2004.00368.x

Pineda-Munoz, S., & Alroy, J. (2014). Dietary characterization of terrestrial mammals. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281(1789). doi: 10.1098/rspb.2014.1173

Pompanon, F., Deagle, B. E., Symondson, W. O. C., Brown, D. S., Jarman, S. N., & Taberlet, P. (2012). Who is eating what: Diet assessment using next generation sequencing. *Molecular Ecology*, 21(8), 1931–1950. doi: 10.1111/j.1365-294X.2011.05403.x

Porter, T. M., & Hajibabaei, M. (2018). Over 2.5 million COI sequences in GenBank and growing. *BioRxiv*, 1–16. doi: 10.1101/353904

Preston, C. R., Jones, R. E., & Horton, N. S. (2017). Golden Eagle Diet Breadth and Reproduction in Relation to Fluctuations in Primary Prey Abundance in Wyoming's Bighorn Basin. *Journal of Raptor Research*, 51(3), 334–346. doi: 10.3356/JRR-16-39.1

Pyšek, P., & Richardson, D. M. (2010). Invasive species, environmental change and management, and health. *Annual Review of Environment and Resources*, 35, 25–55. doi: 10.1146/annurev-environ-033009-095548

Quillfeldt, P., McGill, R. A., & Furness, R. W. (2005). Diet and foraging areas of Southern Ocean seabirds and their prey inferred from stable isotopes: review and case study of Wilson's storm-petrel. *Marine Ecology Progress Series*, 295, 295–304.

- Rathcke, B. (1985). Slugs as Generalist Herbivores : Tests of Three Hypotheses on Plant Choices Published by : Ecological Society of America. *Ecological Society of America*, 66(3), 828–836.
- Rathcke, B., & Lacey, E. P. (1985). Phenological patterns of terrestrial plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*. Vol. 16, 179–214. doi: 10.1146/annurev.es.16.110185.001143
- Rees, M., & Brown, V. K. (1992). Interactions between Invertebrate Herbivores and Plant Competition. *The Journal of Ecology*, 80(2), 353. doi: 10.2307/2261017
- Reynolds, J. C., & Aebischer, N. J. (1991). Comparison and quantification of carnivore diet by faecal analysis: a critique, with recommendations, based on a study of the Fox *Vulpes vulpes*. *Mammal Review*, 21(3), 97–122. doi: 10.1111/j.1365-2907.1991.tb00113.x
- Ricciardi, A. (2003). Predicting the impacts of an introduced species from its invasion history: An empirical approach applied to zebra mussel invasions. *Freshwater Biology*, 48(6), 972–981. doi: 10.1046/j.1365-2427.2003.01071.x
- Ricciardi, A., & Cohen, J. (2007). The invasiveness of an introduced species does not predict its impact. *Biological Invasions*, 9(3), 309–315. doi: 10.1007/s10530-006-9034-4
- 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.
- Rosenzweig, M. L., & MacArthur, R. H. (1963). Graphical Representation and Stability

Conditions of Predator-Prey Interactions. *The American Naturalist*, 97(895), 209–223.

Roubinet, E., Jonsson, T., Malsher, G., Staudacher, K., Traugott, M., Ekbom, B., & Jonsson, M. (2018). High redundancy as well as complementary prey choice characterize generalist predator food webs in agroecosystems. *Scientific Reports*, 8(1), 1–10. doi: 10.1038/s41598-018-26191-0

Rubenstein, D. R., & Hobson, K. A. (2004). From birds to butterflies: Animal movement patterns and stable isotopes. *Trends in Ecology and Evolution*, 19(5), 256–263. doi: 10.1016/j.tree.2004.03.017

Sandberg, P. A., Loudon, J. E., & Sponheimer, M. (2012). Stable Isotope Analysis in Primatology: A Critical Review. *American Journal of Primatology*, 74(11), 969–989. doi: 10.1002/ajp.22053

Sboner, A., Mu, X. J., Greenbaum, D., Auerbach, R., & Gerstein, M. . (2011). The real cost of sequencing. *Genome Biology*, 12(Table 1), 125. Retrieved from <http://genomebiology.com/2011/12/8/125>

Segonzac, M., de Saint Laurent, M., & Casanova, B. (1993). L'enigme du comportement trophique des crevettes Alvinocarididae des sites hydrothermaux de la dorsale medio-atlantique. *Cah.Biol.Mar.*, 34(4), 535–571.

Sessions, L., & Kelly, D. (2002). Predator-mediated apparent competition between an introduced grass, *Agrostis capillaris*, and a native fern, *Botrychium australe* (Ophioglossaceae), in New Zealand. *Oikos*, 96(1), 102–109. doi: 10.1034/j.1600-

0706.2002.960111.x

Simberloff, D., Martin, J. L., Genovesi, P., Maris, V., Wardle, D. A., Aronson, J., ...

Vilà, M. (2013). Impacts of biological invasions: What's what and the way forward.

Trends in Ecology and Evolution, 28(1), 58–66. doi: 10.1016/j.tree.2012.07.013

Smith, P. J., Mcveagh, S. M., Allain, V., & Sanchez, C. (2005). DNA identification of gut

contents of large pelagic fishes. *Journal of Fish Biology*, 67(4), 1178–1183. doi:

10.1111/j.0022-1112.2005.00804.x

Speiser, B. (2001). Food and Feeding Behaviour. In G. M. Barker (Ed.), *The biology of*

terrestrial molluscs (pp. 259–288). CABI.

Stein, E. D., Martinez, M. C., Stiles, S., Miller, P. E., & Zakharov, E. V. (2014). Is DNA

barcoding actually cheaper and faster than traditional morphological methods:

Results from a survey of freshwater bioassessment efforts in the United States?

PLoS ONE, 9(4). doi: 10.1371/journal.pone.0095525

Stone, Z. L., Burns, B., Moorhouse, R., Clout, M. N., Stone, Z. L., Burns, B., ... Clout,

M. N. (2017). New Zealand Ecological Society Kakapo habitat selection on

Hauturu-o-toi in relation to plant phenology Linked references are available on

JSTOR for this article : Kakapo habitat selection on Hauturu-o-toi in relation to

plant phenology. *New Zealand Journal of Ecology*, 41(2), 207–217.

Strauss, S. Y., Stanton, M. L., Emery, N. C., Bradley, C. A., Carleton, A., Dittrich-Reed,

D. R., ... Yoshizuka, E. M. (2009). Cryptic seedling herbivory by nocturnal

introduced generalists impacts survival, performance of native and exotic plants.

Ecology, 90(2), 419–429. doi: 10.1890/07-1533.1

Sulla-Menashe, D., Woodcock, C. E., & Friedl, M. A. (2018). Canadian boreal forest greening and browning trends: An analysis of biogeographic patterns and the relative roles of disturbance versus climate drivers. *Environmental Research Letters*, 13(1). doi: 10.1088/1748-9326/aa9b88

Sultana, S., Ali, M. E., Hossain, M. A. M., Asing, Naquiah, N., & Zaidul, I. S. M. (2018). Universal mini COI barcode for the identification of fish species in processed products. *Food Research International*, 105(October 2017), 19–28. doi: 10.1016/j.foodres.2017.10.065

Summer, H., Grämer, R., & Dröge, P. (2009). Denaturing urea polyacrylamide gel electrophoresis (Urea PAGE). *Journal of Visualized Experiments*, (32), 3–5. doi: 10.3791/1485

Thalinger, B., Wolf, E., Traugott, M., & Wanzenböck, J. (2019). Monitoring spawning migrations of potamodromous fish species via eDNA. *Scientific Reports*, 9(1), 1–11. doi: 10.1038/s41598-019-51398-0

Tieszen, L. L., Boutton, T. W., Tesdahl, K. G., & Slade, N. A. (1983). Fractionation and turnover of stable carbon isotopes in animal tissues: Implications for $\delta^{13}\text{C}$ analysis of diet. *Oecologia*, 57(1–2), 32–37. doi: 10.1007/BF00379558

Traugott, M., Thalinger, B., Wallinger, C., & Sint, D. (2020). Fish as predators and prey: DNA-based assessment of their role in food webs. *Journal of Fish Biology*, (May 2020), 367–382. doi: 10.1111/jfb.14400

- Valdez-Moreno, M., Quintal-Lizama, C., Gómez-Lozano, R., & García-Rivas, M. del C. (2012). Monitoring an alien invasion: DNA barcoding and the identification of lionfish and their prey on coral reefs of the Mexican Caribbean. *PLoS ONE*, 7(6), 1–8. doi: 10.1371/journal.pone.0036636
- Valentini, A., Pompanon, F., & Taberlet, P. (2009). DNA barcoding for ecologists. *Trends in Ecology and Evolution*, 24(2), 110–117. doi: 10.1016/j.tree.2008.09.011
- Van Pelt-Verkuil, E., Van Belkum, A., & Hays, J. P. (2008). Ensuring PCR Quality - Laboratory Organisation, PCR Optimization and Controls. In *Principles and technical aspects of PCR amplification* (p. 190). Springer Science & Business Media.
- Vences, M., Nagy, Z. T., Sonet, G., & Verheyen, E. (2012). DNA barcoding amphibians and reptiles. In W. J. K. and D. L. Erickson (Ed.), *DNA Barcodes: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology* (vol. 858, pp. 79–107). Humana Press, Totowa, NJ. doi: 10.1007/978-1-61779-591-6_5
- Victorin, M. F., Rouleau, E., & Brouillet, L. (1995). *Flore laurentienne*. Les presses de l'Université de Montréal.
- Watling, L., & Norse, E. A. (1998). Disturbance of the seabed by mobile fishing gear: A comparison to forest clearcutting. *Conservation Biology*, 12(6), 1180–1197. doi: 10.1046/j.1523-1739.1998.0120061180.x
- Weller, R. A., Baker, D. J., Glackin, M. M., Roberts, S. J., Schmitt, R. W., Twigg, E. S., & Vimont, D. J. (2019). The challenge of sustaining ocean observations. *Frontiers*

in Marine Science, 6(MAR), 1–18. doi: 10.3389/fmars.2019.00105

Wilby, A., & Brown, V. K. (2001). Herbivory, litter and soil disturbance as determinants of vegetation dynamics during early old-field succession under set-aside. *Oecologia*, 127(2), 259–265. doi: 10.1007/s004420000579

Yu, D. W., Ji, Y., Emerson, B. C., Wang, X., Ye, C., Yang, C., & Ding, Z. (2012). Biodiversity soup: Metabarcoding of arthropods for rapid biodiversity assessment and biomonitoring. *Methods in Ecology and Evolution*, 3(4), 613–623. doi: 10.1111/j.2041-210X.2012.00198.x

Zamora-Silva, A., & Malaquias, M. A. E. (2016). Diet preferences of the Aglajidae: A family of cephalaspidean gastropod predators on tropical and temperate shores. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 96(5), 1101–1112. doi: 10.1017/S0025315415000739

Zimmermann, J., Glöckner, G., Jahn, R., Enke, N., & Gemeinholzer, B. (2015). Metabarcoding vs. morphological identification to assess diatom diversity in environmental studies. *Molecular Ecology Resources*, 15(3), 526–542. doi: 10.1111/1755-0998.12336