

L'IMPACT DES VERS DE TERRE EXOTIQUES SUR LE RECRUTEMENT DES
ESPÈCES VÉGÉTALES FORESTIÈRES DU SUD DU QUÉBEC

par

Mélanie Drouin

mémoire présenté au Département de biologie en vue
de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DES SCIENCES
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, janvier 2014

Le 6 janvier 2014

*le jury a accepté le mémoire de Madame Mélanie Drouin
dans sa version finale.*

Membres du jury

Professeur Robert Bradley
Directeur de recherche
Département de biologie
Université de Sherbrooke

Professeure Line Lapointe
Co-directrice de recherche
Département de biologie
Université Laval

Dr. Sylvain Lerat
Évaluateur interne
Département de biologie
Université de Sherbrooke

Professeur John William (Bill) Shipley
Président rapporteur
Département de biologie
Université de Sherbrooke

SOMMAIRE

Depuis leur introduction par des Européens il y a quelques siècles, les vers de terre se sont propagés dans les sols de l'Amérique du Nord. Depuis les années 2000, plusieurs fronts d'invasion dans les milieux naturels ont soulevés des inquiétudes dans la communauté scientifique. Nous avons analysé les impacts des vers de terre sur la germination des graines et la survie des semis de 14 espèces d'arbres indigènes au Québec, et nous avons investigué les façons dont ils influencent la composition végétale du sous bois, les variables physico-chimiques du sol et les communautés microbiennes en Estrie.

Nos résultats suggèrent que les vers de terre diminuent la germination des graines et les taux de survie des plantules, en plus de provoquer des effets importants chez quelques variables physico-chimiques et groupes microbiens. Nous concluons que les vers de terre exotiques ont le potentiel d'altérer la composition des espèces et le fonctionnement des érablières du sud du Québec.

REMERCIEMENTS

En premier lieu, je tiens à remercier mon directeur de recherche, Robert Bradley, ainsi que ma co-directrice, Line Lapointe, sans qui ce projet de maîtrise n'aurait jamais eu lieu. Leurs conseils judicieux, leur support constant et leur grande compréhension m'ont guidé à travers mon apprentissage de la recherche scientifique. Je remercie également le Dr. Joann Whalen, troisième instigatrice du projet, ainsi que mon comité de conseillers, formé du professeur John William (Bill) Shipley et de Sylvain Lerat, assistant de recherche au Département de biologie de l'Université de Sherbrooke. Vos questions et commentaires m'ont permis d'arriver à un produit fini qui ne tourne pas les coins ronds.

Merci à Benoit Lapointe pour le dépannage technique, à William Frank John (Bill) Parsons pour l'aide en laboratoire, avec les manuscrits et pour les discussions «in English» sur des sujets éclectiques. Merci à Mathieu Dufresne pour l'accompagnement sur le terrain alors que le matériel se faisait lourd à porter. Ce fut un projet de longue haleine que j'aurais eu peine à réussir, n'eut été de l'aide de mes collègues étudiants gradués, particulièrement Antoine Tardif (mon «coloc de bureau»), ainsi que Martine Fugère, Mathieu Gauthier, Pierre-Olivier Jean, Sylvain Pelletier-Bergeron, ainsi que celle des stagiaires Cécile Meyer, Sonia Van Wijk, et Stéphane De La Croix De Lavalette et Médéric Lanoix. Merci à Éric Lapointe et Patrick Cartier de la corporation Domtar pour l'accès aux terres forestières de la compagnie, ainsi qu'à Claudia Lascelles, pour m'avoir permis l'accès au Parc national du Mont Orford.

Je dois un hommage particulier à mon père qui m'a été d'un grand support au long de ce projet, ainsi qu'à ma mère, qui n'aura malheureusement pas l'occasion d'en voir le produit fini. Maman, si j'ai rendu ce projet à terme malgré les difficultés, c'est uniquement parce que je sais à quel point tu y tenais. Tu as été et sera toujours mon plus bel exemple de force et de détermination.

Ce projet a été rendu possible grâce à l'apport financier du Fonds québécois de la recherche sur la nature et les technologies (FQRNT) et par l'appui logistique fourni par la corporation Domtar (Windsor, Canada).

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	iii
REMERCIEMENTS	iv
TABLE DES MATIÈRES	vi
LISTE DES ABBRÉVIATIONS	viii
LISTE DES TABLEAUX	x
LISTE DES FIGURES	xi
CHAPITRE I – INTRODUCTION	1
<i>L'intérêt pour la recherche sur les vers de terre en milieu forestier</i>	1
<i>Effets des vers de terre sur la litière</i>	3
<i>Effets des vers de terre sur la germination des graines et la survie des plantules</i>	4
<i>Effets de vers de terre sur la communauté microbienne du sol</i>	5
<i>Effets des vers de terre sur les propriétés chimiques du sol</i>	7
<i>Emplacement et organisation des milieux de recherche</i>	9
<i>Objectifs et hypothèses</i>	10
CHAPITRE II – NON-NATIVE ANECIC EARTHWORMS (<i>LUMBRICUS TERRESTRIS</i> L.) REDUCE SEED GERMINATION AND SEEDLING SURVIVAL OF TEMPERATE AND BOREAL TREE SPECIES	13
Mise en contexte	13
Highlights	16
Keywords	16
Abstract	16
Introduction	17
Materials and methods	19
<i>Soil and litter collection</i>	19
<i>Microcosm design and bioassay</i>	19

<i>Statistical analyses</i>	21
Results	21
Discussion	24
Acknowledgements	27
References	27
CHAPITRE III – EXOTIC EARTHWORMS AFFECT PLANT RECRUITMENT AND SOIL MICROBIAL COMMUNITIES IN NORTHERN HARDWOOD FORESTS (QUEBEC, CANADA)	30
Mise en contexte	30
Keywords	33
Abstract	33
Introduction	34
Materials and methods	36
<i>Study area, experimental design and field sampling</i>	36
<i>Soil physico-chemical properties</i>	39
<i>Soil microbial community structure</i>	40
<i>Statistical analyses</i>	41
Results	42
Discussion	48
Acknowledgements	56
Literature cited	56
CHAPITRE IV – DISCUSSION ET CONCLUSION	62
BIBLIOGRAPHIE	72

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AMF	Champignon mycorhizien arbusculaire (Arbuscular mycorrhizal fungi)
Af	<i>Athyrium filix-femina</i>
Ap	<i>Acer pennsylvanicum</i>
Ar	<i>Acer rubrum</i>
As	<i>Acer saccharum</i>
At	<i>Arisaema triphyllum</i>
Ba	<i>Betula alleghaniensis</i>
BA	Surface terrière (Basal area)
CEC	Capacité d'échange cationique (Cation exchange capacity)
Cf	<i>Cystopteris fragilis</i>
Di	<i>Dryopteris intermedia</i>
DRN	Drainage
EW	Vers de terre (Earthworms)
EW-FO	Fréquence d'occurrence des vers de terre (Earthworm frequency of occurrence)
FA	Acide gras (Fatty acid)
Fe	Fougères (Ferns)
FF	Couche organique (Forest floor)
Fg	<i>Fagus grandifolia</i>
Fo	Plantes à fleurs non graminées (Forbs)
Fspp.	<i>Fraxinus</i> spp.
Gram	Gramioïdes
Mc	<i>Maianthemum canadense</i>
NLFA	Acide gras de lipide neutre (Neutral lipid fatty acid)
PLFA	Acide gras phospholipidique (Phospholipid fatty acid)
Ps	<i>Prunus serotina</i>
RDA	Analyse de redondance (Redundancy analysis)
Ri	<i>Rubus idaeus</i>
Sc	<i>Sambucus canadense</i>

spp.	Espèces (Species)
Te	<i>Trillium erectum</i>
Tn	<i>Thelypteris noveboracensis</i>
Tr	Arbres (Trees)
VIF	Facteurs d'influence sur la variance (Variance inflation factors)

LISTE DES TABLEAUX

1.	Effect of earthworms on percent seed germination of 14 tree species and Tomato plants (n=5)	22
2.	The effect of earthworms (- EW vs. + EW) on percent survival of tree seedlings and Tomato plants	23
3.	Means, variances, minimum and maximum values of each soil physico-chemical property, as well as site properties	45
4.	Results of linear regressions testing the effects of forest floor thickness (cm), soil pH and EW-FO (# soil cores) on two lipid fractions of various soil microbial groups (ng g ⁻¹)	49

LISTE DES FIGURES

1.	Sampling areas, located in three forests of the Eastern Townships	38
2.	Influence of the EW-FO on species richness and evenness within each of the 40 plots	43
3.	Influence of the EW-FO on the number of plants per plot for seven plant species (or groups of species)	44
4.	Results of the RDA analyses showing the sampling sites, the environmental variables as the independent matrix, and (A) the plant species and (B) the plant species classified in functional groups, as dependant matrixes	47

CHAPITRE I

INTRODUCTION

L'intérêt pour la recherche sur les vers de terre en milieu forestier

De manière générale, la présence des vers de terre est qualifiée de normale et bénéfique par la population de la province de Québec. Par contre, peu de gens savent que la plupart des vers de terre présents dans leur environnement sont en fait des espèces exotiques. En effet, la plupart des vers de terre du nord du continent Nord-Américain n'ont pas survécu à la glaciation du Wisconsin (Gates, 1970). Depuis le retrait des glaciers, il y a environ 11 000 ans, la plus grande partie des sols et des espèces microbiennes et végétales du Canada et du Nord-Est américain ont évolué en absence de vers de terre. On peut donc s'imaginer qu'avant l'arrivée des vers de terre exotiques, les mécanismes de décomposition de la matière organique étaient plus lents et que les propriétés du sol étaient différentes. En engendrant ces modifications, les vers de terre ont vraisemblablement occasionné des impacts sur les espèces végétales indigènes ayant évolué dans les milieux envahis.

La migration naturelle des vers de terre est lente, soit de 5 à 10 m par année (Marinissen et van den Bosch, 1992), et le fait qu'ils soient maintenant observables dans la plupart des milieux aménagés, près des cours d'eau et des habitations, suggère que l'humain est un important agent de dispersion (Gundale *et al.*, 2005; Keller *et al.*, 2005; Tiunov *et al.*, 2006; Cameron *et al.*, 2007; Holdsworth *et al.*, 2007b; Cameron et Bayne, 2009). Des activités telles que la pêche sportive, le vermicompostage et le transport accidentel de cocons font probablement partie des moyens d'introduction des vers de terre dans le milieu naturel (Hendrix et Bohlen, 2002; Bohlen *et al.*, 2004c; Addison, 2009).

Que leur introduction soit volontaire ou non, les vers de terre sont généralement perçus comme des organismes bénéfiques dans l'opinion publique. Déjà au 19^e siècle, Charles Darwin (1881) publiait un ouvrage couvrant la biologie, l'écologie et les bénéfices engendrés par l'action des vers de terre. Encore de nos jours, une part importante de la littérature publiée sur le sujet concerne les vers de terre en milieu agricole (ex.: Talashilkar et Dosani, 2005; Capowiez *et al.*, 2012), ce qui renforce l'image positive des vers de terre. Il est vrai que les vers de terre, auxquels on réfère souvent en tant qu'ingénieurs de l'écosystème, ont la faculté de modifier significativement leur habitat, notamment en agissant sur la décomposition de la matière organique (Cortez et Bouché, 1998), en augmentant la disponibilité des nutriments (Devliegher et Verstraete, 1997) et en améliorant la structure des sols compactés (Capowiez *et al.*, 2012).

Depuis les années 2000, on observe un changement dans les sujets de recherche sur les vers de terre en Amérique du Nord. La présence d'organismes ayant une telle capacité de modifier leur habitat commence à soulever des inquiétudes quant à la sauvegarde de l'intégrité des milieux naturels (Addison, 2009) et on commence à référer aux vers de terre en tant qu'organismes invasifs dans les écosystèmes forestiers du nord du continent. Bien que la présence de vers de terre soit encore incertaine dans plusieurs forêts du sud du Québec, il est possible d'observer de nombreux fronts d'invasion dans les forêts du nord des États Unis (Hale *et al.*, 2005a, b; Suárez *et al.*, 2006; Maerz *et al.*, 2009). Jusqu'à maintenant, la présence des vers de terre en forêt décidue a été associée à une disparition de la couche morte des sols forestiers (Bohlen *et al.*, 2004a, b; Hale *et al.*, 2005a), à un lessivage des nutriments (Bohlen *et al.*, 2004b; Hale *et al.*, 2005b), à une diminution de la biomasse microbienne dans le sol organique ainsi qu'à son augmentation dans le sol minéral (Groffman *et al.*, 2004), à une diminution de la colonisation des racines par les champignons mycorhiziens arbusculaires (AMF) (Lawrence *et al.*, 2003) et finalement à des changements dans la végétation des sous-bois (Gundale, 2002; Hale *et al.*, 2006; Holdsworth *et al.*, 2007a; Corio *et al.*, 2009). Par contre, aucune recherche n'a été effectuée à ce jour sur les effets de l'invasion des vers de terre sur l'intégrité écologique des érablières du sud du Québec. La

baisse dans le recrutement de l'érable à sucre (*Acer saccharum* Marsh.), observée dans le Nord-Est américain par Hale *et al.* (2006), Holdsworth *et al.* (2007a) et Corio *et al.* (2009) est suffisante pour justifier une inquiétude pour l'industrie de l'acériculture ou du papier fin au Québec, qui constitue non seulement une des sources de revenus importantes pour la province, mais également une icône culturelle pour la population québécoise. De plus, la perte de diversité également observée dans certains milieux suite à l'introduction de vers de terre soulève également des préoccupations sur le plan écologique.

Effets des vers de terre sur la litière

Des recherches réalisées au Minnesota, au Wisconsin et dans l'état de New York ont montré une diminution importante de l'épaisseur de la litière dans les zones supportant de fortes densités ou des assemblages complexes de vers de terre (Bohlen *et al.*, 2004a; Hale *et al.*, 2005b; Corio *et al.*, 2009). Knollenberg *et al.* (1985) ont pour leur part rapporté qu'après quatre semaines d'observation dans une plaine alluviale du Michigan, les vers de terre avaient consommé une quantité de litière équivalant à 93.8% de la tombée annuelle. Cortez et Bouché (1998) ont montré que les vers de terre ont peu d'effet sur la décomposition de la litière de certaines espèces dont les feuilles contiennent des métabolites secondaires, comme les chênes (*Quercus* spp.) et les frênes (*Fagus* spp.). Par contre, la décomposition de la litière de ces espèces augmente considérablement avec le temps, indiquant que les vers de terre s'y intéressent davantage après que des bactéries en aient commencé la décomposition. Sur les fronts d'invasion, l'apparition successive des vers de terre épigés (colonisant uniquement la litière), des endogés (creusant des terriers horizontaux permanents dans le sol minéral), et des anéciques (vivant en profondeur dans des terriers verticaux permanents, mais se nourrissant à la surface), illustre la variabilité des préférences d'habitat et des habitudes alimentaires des différents groupes (Hale *et al.*, 2005a). Bien que chacun de ces types de vers de terre ait le potentiel de diminuer l'épaisseur de la couche de litière, et donc d'avoir un impact sur l'intégrité de l'écosystème envahi (Hale, 2004), les vers de terre anéciques sont probablement ceux qui ont le plus grand impact dû à leur faculté d'enfouir d'importantes quantités de litière à des profondeurs considérables dans le sol minéral (Eisenhauer *et al.*, 2008).

Effets des vers de terre sur la germination des graines et la survie des plantules

Des diminutions dans le recrutement de certaines espèces végétales ont été remarquées dans certains milieux forestiers du nord-est américain (Gundale, 2002; Hale *et al.*, 2006; Holdsworth *et al.*, 2007a; Corio *et al.*, 2009) et l'abondance de certaines espèces végétales semble négativement affectée par la présence de vers de terre invasifs dans leur milieu. Bien que les effets des vers de terre sur la végétation des sous-bois forestiers soient de mieux en mieux documentés, peu d'information est à ce jour disponible sur les causes réelles de ces effets. Il est possible que les vers de terre aient un effet considérable sur les espèces végétales en agissant sur la litière. En effet, Hale *et al.* (2006) suggèrent que la perte des qualités protectrices de la litière en tant que milieu de germination pourrait exposer les graines et plantules à la dessiccation et à la prédation, ce qui pourrait également avoir un impact négatif considérable sur le recrutement des espèces affectées. De plus, leur présence aura pour résultat de modifier le milieu de germination des graines et la distribution des racines.

La capacité d'enfouissement des graines par les vers de terre est connue depuis longtemps, puisque déjà au 19^e siècle, en rapportant ses propres observations ainsi que celles des ses collègues, Darwin (1881) mentionnait avoir observé la présence de graines de différentes espèces, dont un grain d'avoine, au fond d'un terrier de vers de terre d'une profondeur de plus de 90 cm. Au cours des dernières décennies, des recherches ont été menées sur les actions des vers de terre sur les graines de différentes espèces. En savane, Decaëns *et al.* (2003) ont rapporté avoir trouvé 164 graines par 100 g de déjections de vers de terre (masse sèche), montrant ainsi la capacité des vers de terre d'ingérer certaines graines et de les disperser, soit verticalement, soit horizontalement (Eisenhauer *et al.*, 2008). Par contre, le transit intestinal semble avoir un effet nuisible sur la germinabilité, puisque Decaëns *et al.* (2003) ont observé des taux de germination de 3 à 40% plus faibles dans les déjections en rapport avec les graines germant dans avec le sol environnant. Sur ce sujet, Grant (1983), qui a observé des délais dans la germination après le transit intestinal, a suggéré que la structure stable des déjections, qui sont également relativement imperméables à l'eau et à l'air, favorise un état de dormance des graines. Par ailleurs, il est possible que certaines graines soient endommagées

lors du transit intestinal. En effet, lors d'une recherche en microcosme, Eisenhauer et al. (2010) ont montré que les *L. terrestris* ont la capacité de digérer les graines de légumineuses et de graminées ingérées, et ce malgré la présence d'un tégument indigeste. Pour cette raison, ils ont donc suggéré que le tégument puisse être endommagé mécaniquement lors du transit intestinal. De plus, le choix des graines ingérées semble dépendre de leur taille, davantage que de leur palatabilité (Pearce *et al.*, 1994).

La préférence des vers de terre pour les graines de certaines espèces pourrait avoir des conséquences directes sur la composition des communautés végétales. Par exemple, Aira et Pearce (2009) ont montré chez deux espèces de graminées que l'espèce à plus grosses graines, le ray-grass anglais (*Lolium perenne*), se trouvait favorisée alors que l'établissement de l'espèce à petites graines, l'agrostis commun (*Agrostis capillaris*), était limité par l'action des *Lumbricus terrestris* qui enfouissaient les graines ou les endommageaient lors de leur digestion. Mais l'effet direct des vers de terre sur les espèces végétales ne s'arrête pas là, puisque Eisenhauer *et al.* (2010) ont également montré que les vers ingèrent également les plantules de certaines espèces. Bien qu'à notre connaissance aucune recherche n'a encore été réalisée sur le comportement des vers de terre face aux espèces végétales forestières, il est possible que les différences observées dans le recrutement de certaines herbacées et jeunes arbres soient causées par l'action directe des vers de terre sur leurs graines ou leurs plantules.

Effets des vers de terre sur la communauté microbienne du sol

En plus d'avoir un impact direct sur le recrutement des semis, il est possible que les vers de terre aient un effet indirect sur le recrutement des espèces végétales en influençant la flore microbienne du sol qu'ils habitent. En effet, les vers de terre tendent à stimuler l'activité microbienne (Binet *et al.*, 1998), ainsi qu'à en modifier grandement la répartition (Groffman *et al.*, 2004). Par exemple, Groffman *et al.* (2004) ont observé une diminution du carbone (C) et de l'azote (N) microbiens dans l'horizon organique des sols forestiers envahis, alors qu'une augmentation disproportionnée se produisait dans le sol minéral. Brown (1995) suggère

qu'une part de la dispersion de la biomasse microbienne s'effectue par transport sur la surface corporelle des vers, alors qu'une autre part semble transportée à même leur tube digestif et est par la suite dispersée dans leurs déjections. En ce sens, il a été montré que le milieu propice que représente le tube digestif des vers de terre tend à stimuler l'activité microbienne, puisqu'un apport constant en carbone organique, un pH presque neutre et un haut taux d'humidité permet aux bactéries ingérées de participer à la digestion des composés récalcitrants et permet subséquemment à leur hôte d'absorber les métabolites dégagés par leur digestion (Brown, 1995). Groffman *et al.* (2004) ont suggéré que le sol minéral possède une plus grande capacité de support que la couche organique pour la biomasse microbienne. Or, une flore microbienne plus dense et diversifiée pourrait engendrer une augmentation globale de la vitesse de décomposition de la matière organique à partir du moment où celle-ci est incorporée dans les horizons minéraux des sols par l'action des vers de terre.

En plus d'affecter la dispersion et la densité des bactéries dans certains profils du sol, les vers de terre semblent avoir un effet important sur les communautés fongiques. Il semble que les champignons représentent une source de nourriture importante, bien que la préférence pour certains champignons puisse varier d'une espèce de vers de terre à l'autre (Bonkowski *et al.*, 2000). L'ingestion de spores et de mycélium peut modifier la densité et la distribution de certaines espèces, dépendamment de leur capacité à survivre au passage dans le tube digestif des vers de terre (Brown, 1995). De plus, il est possible que l'enfouissement de la matière organique par les vers anéciques ait un effet négatif important sur les espèces fongiques colonisatrices de litière. Des résultats obtenus par Lawrence *et al.* (2003) indiquent que la présence de vers de terre provoque ce qui semble être une réponse à un stress chez les champignons mycoriziens arbusculaires (AMF), qui forment une relation symbiotique avec les racines d'une grande proportion des espèces végétales du sud de la province de Québec, dont l'érable à sucre. En effet, Lawrence *et al.* (2003) ont constaté que dans des parcelles contenant des vers de terre, la colonisation racinaire des érables à sucre par les AMF était significativement inférieure à celle observable dans les parcelles sans vers de terre. De plus, dans les parcelles sans vers, la colonisation en surface, soit dans les 5 premiers cm de sol, était significativement plus élevée que dans les parcelles contenant des vers de terre. Dans les

parcelles avec vers de terre, la présence de vésicules (structures de stockage), était plus importante que dans les parcelles sans vers où la colonisation se produisait sous forme d'hyphes. Dans ces parcelles, les vésicules comptaient pour une plus grande proportion de la colonisation des racines, indiquant un facteur de stress en présence des vers de terre. Cependant, ces observations résultent de simples corrélations, et à notre connaissance, aucune recherche expérimentale n'a encore évalué les effets des vers de terre sur la colonisation des racines d'érable à sucre. Par contre, il est possible que les vers de terre servent également d'agents disséminateurs des spores d'AMF, puisque Gange (1993) a trouvé d'importantes quantités de spores et de propagules intactes dans des déjections de surface de *L. terrestris* dans un pâturage en friche du Royaume-Uni.

Effets des vers de terre sur les propriétés chimiques du sol

En accentuant la vitesse de décomposition de la litière, les vers de terre ont des effets considérables sur la distribution et la disponibilité du carbone et de l'azote dans le sol (Addison, 2009). Dans une érablière de l'état de New York, Bohlen *et al.* (2004b) ont rapporté que les vers de terre ont diminué le stockage de carbone de 28% dans les premiers 12 cm, qui correspondaient à l'horizon A du sol minéral. Les pertes de disponibilité du carbone se produisent alors que les composés récalcitrants formés en surface en absence de vers de terre sont exposés à la minéralisation, principalement par la stimulation de l'activité microbienne dans le tube digestif et dans les déjections des vers de terre (Bohlen *et al.*, 2004c) ce qui peut également avoir des impacts importants sur les cycles de plusieurs nutriments (Bohlen *et al.*, 2004a, b). Les pertes de carbone se produisent sous forme de composés de carbone labiles, ainsi que par l'émission de dioxyde de carbone (CO₂), dégagé par la respiration microbienne (Binet *et al.*, 1998). En ce sens, l'introduction de vers de terre dans la forêt boréale, où se trouve l'une des plus grandes réserves de carbone mondiale, pourrait avoir des conséquences importantes pour le stockage global du carbone (Addison, 2009). Par contre, à long terme, l'activité des vers de terre tend également à stabiliser une partie du carbone dans les structures stables que sont leurs déjections (Bohlen *et al.*, 2004c).

La littérature scientifique rapporte également des effets des vers de terre sur presque toutes les étapes du cycle de l'azote, un élément limitant pour la croissance végétale (Bohlen *et al.*, 2004c). Dans une revue de littérature, Brown (1995) mentionne que des recherches ont montré que la présence de vers de terre est associée à une importante hausse de la minéralisation de N dans le sol de pâturages en Angleterre, ce qui aurait pour effet d'augmenter la disponibilité de l'azote inorganique pour la végétation. En effet, Wurst *et al.* (2003) avaient observé une augmentation de la taille des tiges et des racines de deux espèces végétales, le ray-grass anglais et le plantain lancéolé (*Plantago lanceolata*), indiquant une augmentation de la prise de nutriments, possiblement suite à une augmentation de la concentration des nutriments occasionnée par la décomposition facilitée par les vers de terre. D'un autre côté, Groffman *et al.* (2004) ont montré que l'apport d'une importante quantité de carbone (C) dans le sol minéral de deux forêts tempérées du Nord-Est américain, a causé une augmentation de la respiration bactérienne, alors que la minéralisation et la nitrification de N ne semblaient pas changer en rapport avec les valeurs obtenues dans des sols sans vers de terre. Il est possible que ces conclusions divergentes soient dues à des observations réalisées dans des milieux très différents. Decaëns *et al.* (1999) ont rapporté de fortes concentrations en ammonium (NH_4^+) dans les déjections fraîches de vers de terre, en comparaison aux concentrations trouvées dans le sol environnant. Par contre, cette concentration a connu une décroissance rapide dans les jours suivants, laissant place à trois pics successifs dans les concentrations de nitrate (NO_3^-), probablement causés par une nitrification intensive par la biomasse microbienne, suivie par un lessivage du NO_3^- dans le sol environnant. Bradley *et al.* (2011) ont estimé que par leur action de broyage de la matière organique, les vers de terre peuvent augmenter la dénitrification et par la même occasion augmenter la production d'oxyde nitreux (N_2O), un gaz à effet de serre. En ce sens, Karsten et Drake (1997) ont observé jusqu'à 256 fois plus de bactéries dénitrifiantes dans des tubes digestifs de vers de terre que dans les sols environnants et des incubations anaérobiques des intestins de vers de terre avec ajout de NO_3^- ont dégagé des concentrations de N_2O plus élevées que celles de sols homogénéisés. Au cours de la même recherche, des vers de terre provenant d'un sol forestier acide (pH 4,6) ont produit des émissions de N_2O à une moyenne de 145 pmol/h/g, comparativement à une émission de 45 pmol/h/g pour le sol sans vers de terre, alors que les

émissions des vers provenant d'un sol moins acide (pH 6) étaient beaucoup plus élevées, soit de 884 pmol/h/g pour les vers et 2 pmol/h/g pour le sol, ce qui indique qu'une hausse du pH dans le sol forestier pourrait accentuer la dénitrification et l'augmentation d'émission de N₂O. Comme il a été montré par Eisenhauer *et al.* (2007) que certaines espèces de vers de terre, dont *L. terrestris*, peuvent augmenter le pH de leur habitat en remontant du sol minéral alcalin des horizons inférieurs vers la surface du sol, il est possible que ces espèces soient à l'origine d'une hausse d'émissions de gaz effet de serre dans certains milieux forestiers.

Emplacement et organisation des milieux de recherche

Les résultats obtenus par Aira et Pearce (2009), indiquant que *L. terrestris* pouvait influencer le recrutement d'une espèce en fonction de la taille de ses graines, furent un point de départ dans notre recherche. En effet, de nombreuses espèces d'arbres forestiers du sud de la province produisent des graines de tailles très variées, ce qui pourrait influencer leur recrutement en présence de vers de terre. Nous avons donc évalué les effets du *L. terrestris* sur le pourcentage de germination, les moments de germination, le pourcentage de survie et la biomasse des plantules de 14 espèces d'arbres indigènes de la province de Québec, auxquelles nous avons ajouté une quinzième espèce, la tomate, en guise de témoin. La réalisation d'une telle expérience aurait été difficile à réaliser en milieu naturel, puisqu'il aurait fallu empêcher la germination de toute graine ne faisant pas partie de l'expérience, et il aurait été nécessaire de protéger nos plantules contre l'herbivorie. De plus, il nous aurait fallu contrôler la densité de vers de terre en milieu naturel. Pour éviter ces problèmes potentiels, nous avons choisi de réaliser une expérience en microcosme, et d'installer ceux-ci dans les serres de l'Université Laval, où l'expérience s'est déroulée du mois de janvier à août 2012.

La recherche en microcosme nous a fourni des pistes sur la façon dont les vers de terre de l'espèce *L. terrestris* peuvent affecter le recrutement des espèces végétales en milieu forestier. Cependant, une étude intensive en milieu naturel s'avérerait nécessaire pour comprendre les effets réels des vers de terre sur le recrutement des espèces végétales au sud du Québec. Pour

cette raison, nous avons situé le second volet de notre recherche dans 40 érablières à tilleul (Gosselin, 2007) de la région de l'Estrie, au sud-est de la province de Québec. Vingt de ces érablières se trouvaient dans le secteur Watopeka, une forêt privée de la papetière Domtar. Dix autres étaient situées dans le parc national du Mont Orford, alors que dix autres étaient situées sur le mont Bellevue, dans la ville de Sherbrooke. Le choix des sites fut basé sur ce type de forêts, puisque des résultats de Hale *et al.* (2006), Holdsworth *et al.* (2007a) et de Corio *et al.* (2009) semblaient indiquer que les vers de terre avaient des effets négatifs importants sur le recrutement de cette espèce à haute valeur économique et culturelle de la province. Le second critère pour l'établissement de nos parcelles concernait l'âge approximatif des forêts, en se basant sur les données de surface terrière, évaluées avec un prisme de facteur 2. Finalement, selon notre troisième critère, tous nos secteurs forestiers avaient des usages similaires, soit la randonnée pédestre ou la chasse. Les 40 parcelles délimitées dans les 5 secteurs furent visitées à plusieurs reprises de l'automne 2010 à l'automne 2012, alors que nous avons réalisé des inventaires de végétation, des inventaires de vers de terre et des prélèvements d'échantillons de sol. Les données recueillies furent utilisées pour analyser les effets de différentes fréquences d'occurrence des vers de terre (EW-FO) sur la diversité, la richesse spécifique et l'abondance relative des espèces végétales du sous-bois, sur le recrutement de certaines espèces, sur différentes variables physico-chimiques des sols, ainsi que sur la communauté microbienne des sols.

Objectifs et hypothèses

L'objectif principal de notre recherche était de tester l'effet des vers de terre sur le recrutement de certaines espèces forestières. Dans le cadre du premier volet de la recherche, soit un volet en microcosme, notre but était de tester l'importance de la taille des graines comme facteur discriminant par les vers de terre, ce qui pourrait par la suite affecter le recrutement en sous-bois. Nous avons donc analysé l'effet des vers de terre sur le pourcentage de germination, le moment de germination, le pourcentage de survie ainsi que la biomasse des plantules. Pour le second volet, le premier objectif était de confirmer que les vers de terre

ne sont pas omniprésents dans les forêts du sud du Québec. Le second objectif consistait à vérifier si la EW-FO était reliée à des changements dans l'abondance relative d'espèces végétales de sous-bois et à une réduction globale de la diversité végétale. Notre troisième et dernier objectif était d'explorer les relations entre les variables physico-chimiques du sol, l'abondance des vers de terre et la biomasse microbiennes et fongique.

Hypothèses – volet 1

- 1.1 Les *L. terrestris* favoriseront la germination des espèces à grosses graines qui risquent moins d'être ingérées par les vers de terre.
- 1.2 Les *L. terrestris* causeront un retard dans la germination des espèces à petites graines, possiblement dû à l'enfouissement dans le sol ou encore à des dommages occasionnés par le transit intestinal..
- 1.3 Les *L. terrestris* auront un effet négatif sur la survie des plantules de plus petite taille, qui sont sujettes à un plus grand risque d'ingestion par les vers de terre.
- 1.4 La biomasse des plantules augmentera avec l'augmentation de la densité des *L. terrestris*, puisque leur présence pourrait faciliter la décomposition de la matière organique et augmenter la disponibilité des nutriments.

Hypothèses - volet 2

- 2.1 La diversité des espèces végétales diminuera avec une augmentation de la EW-FO.
- 2.2 L'abondance de certaines espèces végétales diminuera avec l'augmentation de la EW-FO.

- 2.3 La EW-FO influencera significativement des valeurs des variables physico-chimiques du sol, telles le pH dans l'eau, le pourcentage de carbone et d'azote, le rapport carbone/azote, le pourcentage d'argile, le pourcentage de sable, le sodium, le calcium, le magnésium, le potassium, la capacité d'échange cationique, le rapport ammonium/azote total et le rapport nitrites/azote total.

- 2.4 La densité des AMF diminuera avec l'augmentation de la EW-FO.

- 2.5 La biomasse microbienne du sol augmentera avec l'augmentation de la EW-FO, alors que la biomasse fongique diminuera en fonction de la même variable.

CHAPITRE II

NON-NATIVE ANECIC EARTHWORMS (*LUMBRICUS TERRESTRIS* L.) REDUCE SEED GERMINATION AND SEEDLING SURVIVAL OF TEMPERATE AND BOREAL TREE SPECIES

Mise en contexte

Des études récentes ont montré que l'introduction de vers de terre exotiques dans des sols forestiers nord-américains pourrait avoir des impacts négatifs sur le recrutement de certaines espèces végétales indigènes. Par ailleurs, des auteurs ont montré que les graines de petite taille étaient plus vulnérables à un enfouissement trop profond par les vers de terre, ce qui limiterait leur germination, et favoriserait ainsi l'établissement d'espèces à plus grosses graines. Puisqu'à notre connaissance, aucune information n'était à ce jour disponible sur la façon dont les *L. terrestris* peuvent agir sur les graines des espèces d'arbres indigènes de la province de Québec, nous avons conçu une recherche en microcosme afin de tester les effets de ces vers anéciques sur le nombre de jours requis pour la germination, sur le pourcentage de germination, sur la survie et sur la biomasse des plantules de 14 espèces d'arbres sélectionnées en fonction de la taille de leurs graines. Nos résultats suggèrent que l'introduction des *L. terrestris* dans les écosystèmes forestiers de la province de Québec a le potentiel d'altérer la composition des espèces, et ce par plusieurs mécanismes qui affecteront le recrutement de diverses espèces d'arbres indigènes.

Un manuscrit fut soumis le 14 juillet 2013 au périodique *Applied Soil Ecology* en vue d'une révision par les pairs. Des modifications furent réalisées en fonction des commentaires reçus, puis une version finale de l'article fut soumise et acceptée par le périodique en vue d'une publication sous forme de courte communication. La première auteure de l'article, Mélanie Drouin, réalisa le montage, la prise de données, les analyses statistiques et la rédaction, sous la supervision de son directeur de recherche, le professeur Robert Bradley (Université de Sherbrooke), ainsi que de sa co-directrice, la professeure Line Lapointe (Université Laval). La quatrième auteure de l'article est la Dr. Joann Whalen (Université McGill) qui a participé

à l'élaboration initiale des idées constituant le projet, qui a commenté le manuscrit avant sa soumission et qui a rédigé la demande de subvention au Fonds québécois de la recherche sur la nature et les technologies (FQRNT), nous permettant d'obtenir le financement requis pour mettre le projet en action.

**NON-NATIVE ANECIC EARTHWORMS (*LUMBRICUS TERRESTRIS* L.) REDUCE
SEED GERMINATION AND SEEDLING SURVIVAL OF TEMPERATE AND
BOREAL TREE SPECIES**

Mélanie Drouin^a, Robert Bradley^{a,*}, Line Lapointe^b, Joann Whalen^c

^aDépartement de biologie, Université de Sherbrooke., 2500 boul. de l'Université, Sherbrooke,
Québec, J1K 2R1, Canada

^bDépartement de biologie, Université Laval, 2325 rue de l'Université, Québec, Québec, G1V
0A6, Canada

^cDepartment of Natural Resource Sciences, Macdonald Campus of McGill University, 21111
Lakeshore Road, Ste-Anne de Bellevue, Québec, H9X 3V9, Canada

*Corresponding author. Tel.: +1 819 821 8000, Fax. 62080; fax: +1 819 821 8049,
E-mail address: Robert.Bradley@USherbrooke.ca

Highlights

- Non-native earthworms (EW) may reduce the recruitment of forest understory plants
- Seeds of 14 tree species were germinated and grown in the presence/absence of EW
- EW reduced percent seed germination of 7 tree species
- EW reduced seedling survival of 3 tree species
- The introduction of EW in forest ecosystems may alter forest tree diversity

Keywords

Lumbricus terrestris, Northern temperate and boreal tree species, seed germination, seedling survival

Abstract

Recent studies have shown that the introduction of non-native earthworms in previously earthworm-free soils may have negative impacts on the recruitment of certain understory plant species in northern temperate forests. There is a need, therefore, to understand the mechanisms that may underlie this phenomenon. A microcosm study was conducted to test the effects of the anecic earthworm, *Lumbricus terrestris* L., on the number of days for germination, percent seed germination, seedling survival and seedling biomass of 14 tree species native to southern Quebec (Canada). Seeds of these species were germinated and grown in the presence or absence of *L. terrestris*. The presence of earthworms significantly reduced percent seed germination of seven tree species, as well as seedling survival of three tree species. The mean germination time of three tree species was significantly affected, either positively or negatively, by the presence of earthworms. Earthworms had no effect on seedling biomass. Results suggest that the introduction of *L. terrestris* into forested ecosystems of southern Québec may potentially alter overstory composition through several mechanisms that differentially affect the recruitment of various tree species in the understory.

1. Introduction

It is known that most indigenous earthworm species of North America did not survive the Wisconsin glaciation, which receded approximately 11,000 years ago (Gates, 1970). Thus, in the province of Quebec (Canada), 17 of the 19 known earthworm species have been introduced, most likely by European settlers (Reynolds and Reynolds, 1992; Addison, 2009). These earthworm species migrate no faster than 5-10 m per year (Addison, 2009), and they are often confined to specific locations because of natural obstacles obstructing their movement. Their seemingly non-random distribution in agricultural fields, near roads and around lakes strongly suggests that their introduction into new areas is mainly mediated by humans, such as transport within tire treads or dumping of bait by fishermen (Hendrix and Bohlen, 2002; Callahan, et al., 2006; Hale, 2008). Deciding whether or not measures should be taken to thwart this biological invasion requires an understanding of the impacts of non-native earthworms in previously earthworm-free soils.

In agroecosystems of southern Quebec, earthworms have traditionally been considered beneficial soil organisms that facilitate litter decomposition, increase nutrient availability and improve soil structure (e.g., Ramsay and Hill, 1978). Earthworm activities could have, however, a negative impact on the integrity of natural forest ecosystems. For example, some earthworm species dig vertical burrows to depths of 2–3 m, which may increase hydraulic conductivity in soils and nutrient export from watersheds (Domínguez et al., 2004). This phenomenon could be further exacerbated by the earthworm-mediated removal of organic forest floors, which retain more moisture than mineral soil horizons. Secondly, earthworms accelerate the decomposition of humified soil organic matter, and may thereby reduce C storage capacity of forest soils and increasing atmospheric CO₂. Thirdly, studies in Northern Minnesota and Wisconsin have shown that exotic earthworm invasions in northern temperate forests coincide with a loss of understory herbaceous species and a low recruitment of Sugar Maple (*Acer saccharum* Marsh.) (Hale et al., 2006; Corio et al., 2009). Regarding this latter point, Forey et al. (2011) summarized our current state of knowledge on earthworm–seed interactions, and suggested a need for manipulative experiments that would help us to

mechanistically understand these interactions in driving plant community assembly. For example, it remains unclear whether the reduced abundance of some plant species is due to lower seed germination rates or to lower seedling survival.

The reported negative impact of exotic earthworms on Sugar Maple recruitment is of particular concern in Quebec (Canada). Sugar Maple is not only a commercially valued tree species that is widespread across southern Quebec; it is also a cultural icon due to the popular celebration of the maple syrup industry. Moreover, southern Quebec is the region with the highest plant species richness in the province, where natural mixedwood stands may often contain more than 10 co-occurring tree species (Leckie et al., 2000). Many of these species also have high economic value, and it is hypothesized that they may vary in their vulnerability to earthworms. For example, Milcu et al. (2006) found that the recruitment of herbaceous species (i.e., grasses, legumes and herbs) was related to seed-size, with small seeded species being repressed and large-seeded species being promoted. Thus, a species whose seed germination rate and seedling survival are not negatively affected by earthworms, may increase its competitive ability relative to those species that are more vulnerable. For example, Holdsworth et al. (2007) found a decrease in Sugar Maple recruitment, and a concomitant increase in the abundance of Ash (*Fraxinus* sp.) seedlings, as earthworm abundances increased in a Minnesota forest. It is especially important, therefore, to test the vulnerability of seeds and seedlings of Sugar Maple to the presence of exotic earthworms, relative to other tree species from southern Quebec.

Here we report on a microcosm study where we tested the effect of the anecic earthworm species, *Lumbricus terrestris* L., on the number of days for germination, percent seed germination, seedling survival and seedling biomass of 14 tree species native to southern Quebec. A longer germination time could either indicate that the earthworms are ingesting the seeds, which then have to resurface to germinate, or that the earthworms are modifying the habitat conditions, making them less favorable to allow germination of the affected species. If coupled with a lower germination rate or a poor seedling survival rate, this could indicate that the earthworms have the potential to modify the species composition of forest

ecosystems of southern Quebec. We chose to work with *L. terrestris* because it is widespread in this region, because it is the most commonly used as fishing bait (Keller et al., 2007) and thus most prone to be dispersed in forests by anglers, and because its anecic lifestyle will likely have an important impact on soil processes.

2. Materials and method

2.1 Soil and litter collection

The soil and the litter used for this experiment were collected in October 2011 from an earthworm-free mature Sugar Maple stand near the town of Windsor, Canada (ca. 45°36'N, 71°44'W). Approximately 0.75 m³ of fresh mineral soil (0–30 cm depth) was transported to a greenhouse at Laval University (Quebec City, Quebec, Canada). The soil was sieved to pass a 5 mm mesh and homogenized by gently mixing. Approximately 5 kg (dry wt. equiv.) of newly fallen Sugar Maple and Red Maple (*Acer rubrum* L.) leaf litter was handpicked from the same site. The litter was then air-dried at 35 °C, coarsely shred by hand, and kept in plastic buckets with lids.

2.2 Microcosm design and bioassay

In order to test the effects of earthworms on the germination and survival of tree seedling species from Eastern Canada, we constructed 170 microcosms consisting of 30 cm long PVC tubes with an inner dia. of 10 cm. The bottom end of each tube was lined with a 1 mm mesh nylon net, and the tubes were then placed vertically on metal mesh tables in a greenhouse where the lighting was set to a day:night cycle of 14:10 h. Approximately 2.65 kg (dry wt. equiv.) of soil was transferred in each tube and gently tamped up to 5 cm from the upper edge.

The experimental design consisted of a factorial array of two earthworm levels (i.e., with or without earthworms) seeds from 15 plant species. Four mature specimens of *L. terrestris*, which were obtained from a local fishing supplies store, were added to 85 microcosms. The top of each microcosm was then lined with 1 mm mesh nylon net to prevent earthworms from escaping. Seeds from 1 of 15 plant species were sown at ca. 1–2 cm depth in each microcosm. The plant species consisted of 14 northern temperate forest tree species + Tomato (*Solanum lycopersicum*). Tomato was used as a “reference” species, as a preliminary study had shown Tomato seeds and seedlings to be readily damaged by *L. terrestris* (data not shown). The tree species were American Elm (*Ulmus americana* L.), Balsam Fir (*Abies balsamea* (L.) Mill.), Bitternut Hickory (*Carya cordiformis* Sarg.), Black Spruce (*Picea mariana* (Mill.) B.S.P.), Bur Oak (*Quercus macrocarpa* Michx.), Eastern White Cedar (*Thuja occidentalis* L.), Jack Pine (*Pinus banksiana* Lamb.), Paper Birch (*Betula papyrifera* Marsh.), Tamarack (*Larix laricina* (Du Roi) Koch), White Pine (*Pinus strobus* L.), White Spruce (*Picea glauca* (Moench) Voss.), Yellow Birch (*Betula alleghaniensis* Britt.), Red Maple and Sugar Maple. All seeds were obtained from the *ministère des Ressources naturelles du Québec*. Thirty seeds were planted in each microcosm except those of Bitternut Hickory and Bur Oak, whose larger size incited us to plant only 15 seeds per microcosm. All treatments were replicated 5 times, except those with Bitternut Hickory and Bur Oak, which were replicated 10 times. Litterfall was simulated by adding 5 g of litter, which represented a litter depth of about 1 cm, to all microcosms at the beginning of the bioassay experiment, and 3 g of litter each week thereafter, in order to ensure that the earthworms would survive throughout the experiment.

Plants were grown from January to June 2012. At 2–3 day intervals during this period, each microcosm was watered to field capacity and seedlings were counted and marked, which allowed us to note the germination date and the survival of all individual seedlings. The percent germination in each microcosm was calculated as the number of germinated seeds within 30 days of the first seed germination. At the end of this 30-day period, soil was sieved and buried seeds that had germinated were also included in our calculation of percent seed germination. The percent survival in each microcosm was calculated as the number of

thriving seedlings at the end of the 30-day period, relative to the total number of germinated seeds. The mean number of days for germination of each treatment was based on the median germination date within each microcosm, that is, the day corresponding to 50% of total germination. At the end of the bioassay, we measured the average dry mass of surviving seedlings in each microcosm. Earthworm survival rate at the end of the study was >95%.

2.3 Statistical analyses

We first used two-way ANOVA to test the effects of tree species, earthworms, and tree species \times earthworm interactions, on all response variables. The proportional data were arcsine–square root transformed prior to these analyses. When significant tree species \times earthworm interactions were found, the effects of earthworms within each tree species were tested using generalized linear models (GLM). First, the overall earthworm effects on percent germination and percent survival were tested by logistic regression for proportional data with binomial distributions. However, these models were over-dispersed, so we re-analyzed the data after specifying a quasibinomial distribution, and tested the significance of these models with F -tests. We then tested, in the same way, the effects of earthworms on percent germination and percent survival within each plant species. Given that comparisons of survival rates are less robust as percent germination rates decrease, the effect of earthworms on survival rates was not tested for the five tree species that had less than 15% seed germination in one or both earthworm treatments. The remaining 10 comparisons were more robust as they all had 20–100% seed germination rates (i.e., 30–150 germinated seeds per treatment). The effects of earthworms on the number of days for germination and on seedling biomass were tested within each tree species using Student t -tests. All statistical analyses were performed using R statistical software (Version 2.14.0).

3. Results

Germination rates ranged from 97% (Tomato) to only 7% (Eastern White Cedar) across all species (Table 1). Two-way ANOVA revealed significant effects of tree species ($F_{14,120} = 61.8$, $P < 0.001$), earthworms ($F_{1,120} = 56.4$, $P < 0.001$), and tree species \times earthworm interaction ($F_{14,120} = 5.63$, $P < 0.001$) on percent seed germination. The average percent germination rate was significantly higher in microcosms without earthworms (48%) than with earthworms (26%). Results of logistic regressions confirmed that earthworm significantly reduced percent seed germination for 8 of the 15 species (Table 1). Among the seven non-significant comparisons, four of these were among those species with the lowest percent germination rates, which reduced the statistical power of the tests.

Table 1: Effect of earthworms on percent seed germination of 14 tree species and Tomato plants (n=5) as determined by logistic regressions for proportional data with binomial distributions.

Species	- Earthworms (%)	+ Earthworms (%)	<i>t</i> -value	P > <i>t</i>
Tomato	97	61	4.34	0.002
Sugar Maple	91	90	1.66	0.135
Red Maple	80	70	0.51	0.627
Balsam Fir	79	47	3.01	0.017
Black Spruce	73	32	4.49	<0.001
Bur Oak	63	29	5.11	<0.001
Jack Pine	57	25	5.32	<0.001
White Spruce	50	21	2.5	0.037
White Pine	46	17	4.81	0.001
American Elm	27	27	0	1
Bitternut Hickory	15	9	4.47	<0.001
Yellow Birch	11	6	1.97	0.084
Paper birch	9	7	0.8	0.447
Tamarack	9	3	1.95	0.087
Eastern White Cedar	7	15	-1.59	0.150

Significant comparisons are highlighted in bold.

Of those seeds that germinated, seedling survival rates ranged from 100% (Bur Oak) to only 13% (Black Spruce) across all species (Table 2). Two-way ANOVA revealed significant effects of tree species ($F_{14,120} = 29.9, P < 0.001$), earthworms ($F_{1,120} = 21.0, P < 0.001$), and tree species \times earthworm interaction ($F_{14,120} = 4.79, P < 0.001$) on percent seedling survival. The average percent survival rate was significantly higher in microcosms without earthworms (64%) than with earthworms (50%). Results of logistic regressions confirmed that earthworms significantly reduced percent survival for 4 of the 10 species that were tested (Table 2). There was no trend among the five species that had been excluded from these analyses (i.e., species not meeting our criterion for sample size).

The median number of days for germination ranged from 3 days (Red Maple) to 111 days (Bitternut Hickory) across all species. Two-way ANOVA revealed no main effect of earthworms ($F_{1,120} = 0.13, P = 0.717$), but significant effects of tree species ($F_{14,120} = 158, P < 0.001$) and tree species \times earthworm interaction ($F_{14,120} = 2.19, P < 0.01$) on the median number of days for germination. Individual *t*-tests within each tree species found that earthworms significantly delayed germination for Bitternut Hickory (86 vs. 103 days), but significantly hastened germination for Balsam Fir (35 vs. 30 days) and eastern White Pine (39 vs. 33 days).

Two-way ANOVA showed a significant effect of tree species ($F = 57.8, P < 0.001$) on mean seedling biomass, but no significant effects of earthworms ($F = 0.69, P = 0.409$) or species \times earthworm interaction ($F = 0.34, P = 0.984$), on seedling biomass.

4. Discussion

Taken collectively, our data suggest that the introduction of *L. terrestris* into forested ecosystems of southern Québec may potentially alter overstory composition through several mechanisms that differentially affect the recruitment of various tree species in the understory. Firstly, our data show that earthworms may reduce seed germination of some tree species,

Table 2: The effect of earthworms (- EW vs. + EW) on percent survival of tree seedlings and Tomato plants as determined by logistic regressions for proportional data with binomial distribution.

Species	No. of seeds germinated		No. of surviving seedlings		% survival		t-value	P > t
	- EW	+ EW	- EW	+ EW	- EW (%)	+ EW (%)		
Tomato	154	91	148	37	96	41	6.86	<0.001
Sugar Maple	137	135	79	107	58	79	-1.74	0.12
Red Maple	120	105	58	20	48	19	2.98	0.018
Balsam Fir	118	71	109	48	92	68	4.14	0.003
Black Spruce	110	48	28	6	25	13	1.53	0.164
Bur Oak	94	44	94	44	100	100	n.a.	n.a.
Jack Pine	86	37	36	15	42	41	0.38	0.712
White Spruce	75	31	37	8	49	26	3.06	0.016
White Pine	69	26	64	21	93	81	1.27	0.239
American Elm	41	41	32	30	78	73	-0.36	0.727
Bitternut Hickory	22	13	20	12	91	92	excluded	excluded
Yellow Birch	17	9	9	2	53	22	excluded	excluded
Paper birch	14	10	7	4	50	40	excluded	excluded
Tamarack	14	4	9	1	64	25	excluded	excluded
Eastern white cedar	10	23	2	6	20	26	excluded	excluded

Species that had less than 15% seed germination in one (or both) earthworm treatment were excluded from the analyses; no t-value was computed for Bur Oak (n.a. = not applicable) because perfect data (i.e., all replicates have 100% survival) cannot be analyzed with a t-test; n.s = not significant; statistically significant (P<0.05) comparisons are highlighted in bold

while others are unaffected. It has been reported that smaller seeds of graminoid and herbaceous species are more prone to be buried and/or ingested by earthworms, which ostensibly reduces their germination rate (Milcu et al. 2006; Aira and Pearce 2009). However, smaller seed size did not seem to play a part in our study, as earthworms significantly reduced the percent germination of two species with the largest seeds (i.e., Bitternut Hickory and Bur Oak). For these two species, we did not detect any seed burial but rather the opposite, that is, earthworm activity unearthed these larger seeds. Combined to the removal of the surface litter by earthworms, it is possible that a lower germination rate for these two species resulted from desiccation due to exposure. Regardless of the mechanism, we posit that selective seed caching and/or seed predation and/or seed desiccation occurring under field conditions could alter tree recruitment dynamics in southern Quebec. Equally of concern is the fact that the five conifer species whose seed germination was reduced by earthworms (i.e., Balsam Fir, Black Spruce, Jack Pine, White Spruce and White Pine) have a natural range that extends north into the boreal forest, where the presence of earthworms in previously earthworm-free soils was recently reported (Cameron and Bayne 2009).

Although earthworms may favor the growth of some herbaceous plants and tree seedlings (e.g., Haimi et al., 1992; Milcu et al., 2006), we did not observe a positive effect on seedling biomass due to earthworms, which is not surprising considering that the seeds contain enough nutrient to meet the requirement for plant growth for several weeks after germination (Shipley, Pers. comm.). However, seedling survival of three tree species was significantly reduced in the presence of earthworms. The main mechanism by which survival was reduced was the downward transport and burial of seedlings in earthworm burrows. The question, then, is why did some tree species resist to this disturbance? A likely explanation is seedling size, which is related to seed size. This is corroborated by the fact that survival of the two species with the largest seed size (i.e., Bur Oak and Sugar Maple) was not affected by earthworms. Likewise, Bitternut Hickory seedlings (i.e., larger seeds than Sugar Maple) also had relatively high survival rates, although low germination rates prompted us to exclude this species from our analyses. Another possible way by which seedlings may escape earthworm disturbance is by producing chemical compounds that incite avoidance. While there is little

direct empirical evidence for this, it is known that earthworms preferentially aggregate under certain plant species (e.g., Westernacher and Graff, 1987) and that their growth rates are linked to the chemical quality of the plant litter they consume (Bradley et al., 2011).

The fact that seed germination and seedling survival of Sugar Maple were unaffected by the presence of earthworms came as a surprise to us, as previous field studies had shown a decrease in the recruitment of this species along invasion fronts of *Lumbricus* sp. (Hale et al., 2006; Holdsworth et al., 2007; Corio et al., 2009). Perhaps this antagonist effect observed under field conditions is related to a decrease in Sugar Maple root colonization by arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) due to earthworms, as reported by Lawrence et al. (2003). Fully beneficial AMF networks most likely take more time to establish than the time allotted in our study, which would preclude any possible effects of earthworms on AMF. Furthermore, AMF are expected to provide benefits to seedlings only in stressful environments, which may not have occurred in our microcosms. Another possible explanation for the discrepancy between our results and previous field studies is that extensive litter consumption by earthworms in the field may eventually expose the shallow Sugar Maple root system to loss of moisture (Corio et al., 2009). Our study did not allow for this to occur, as microcosms were regularly watered and replenished with litter.

Past studies have shown that earthworms exert variable effects on average seed germination dates. For example, Tomati et al. (1988) and Ayanlaja et al. (2001) reported earlier seed germination due to earthworm compounds breaking seed dormancy, whereas Grant (1983) reported delayed seed germination after the gut passage through *L. terrestris*. Likewise, our study revealed significant yet divergent effects of *L. terrestris* on the germination of 3 of the tested tree species. If such idiosyncratic changes in seed germination dates were to occur under natural field conditions, it could possibly lead to unpredictable changes in tree community assembly due to stochastic changes in establishment and growth conditions at the time of germination.

Diamond (1986) provided an insightful analysis of the strength and weaknesses of laboratory

(or greenhouse) microcosm experiments, relative to field experiments and natural field surveys. Microcosm experiments allow us to control experimental conditions thereby maximizing the variability ascribed to experimental factors (i.e., high precision); they lack, however, in realism and generalizability (i.e., low accuracy). Thus, our study could be criticized for its artificial conditions. For example, Milcu et al. (2006) performed a similar microcosm study using herbaceous plant species and earthworm (also *L. terrestris*) densities approximately 4 times lower than ours. The earthworm density that we used (i.e., 509 individuals m⁻² at furrow depth) was conceived to verge on the highest densities (i.e., 466 individuals m⁻² at furrow depth) of mixed earthworm communities (that included *L. terrestris*) observed by Kernecker (2013) in mixedwood forests of southern Quebec. Our experimental conditions were meant, therefore, to represent realistic, albeit above average, earthworm densities in southern Quebec. Thus, the value of our study is in showing the relative vulnerability of seeds and seedlings of different tree species to earthworm disturbances, rather than in providing data that immediately can be extrapolated to the real world. In a forthcoming paper, we will report on an extensive field survey that will quantify the relationship between earthworm densities, soil properties and understory plant community composition.

Aknowledgements

This study was made possible thanks to a “Team Grant” awarded by the Fonds québécois de la recherche sur la nature et les technologies.

References

Addison, J.A., 2009. Distribution and impacts of invasive earthworms in Canadian forests ecosystems. *Biol. Inv.* 11, 59–79.

- Aira, M., Pearce, T.G., 2009. The earthworm *Lumbricus terrestris* favours the establishment of *Lolium perenne* over *Agrostis capillaris* seedlings through seed consumption and burial. *Appl. Soil Ecol.* 41, 360–363.
- Ayanlaja, S.A., Owa, S.O., Adigun, M.O., Senjobi, B.A., Olaleye A.O., 2001. Leachate from earthworm castings breaks seed dormancy and preferentially promotes radicle growth in jute. *HortScience* 36, 143–144.
- Bradley, R.L., Whalen, J., Chagnon, P.-L., Lanoix, M., Alves, M.C., 2011. Nitrous oxide production and potential denitrification in soils from riparian buffer strips: influence of earthworms and plant litter. *Appl. Soil Ecol.* 47, 6–13.
- Callaham Jr., M.A., Gonzalez, G., Hale, C.M., Heneghan, L., 2006. Policy and management responses to earthworm invasions in North America. *Biol. Inv.* 8, 1317–1329.
- Cameron, E.K., Bayne, E.M., 2009. Road age and its importance in earthworm invasion of northern boreal forests. *J. Appl. Ecol.* 46, 28–36.
- Corio, K., Wolf, A., Draney, M., Fewless, G., 2009. Exotic earthworms of great lakes forests: a search for indicator plant species in maple forests. *For. Ecol. Manage.* 258, 1059–1066.
- Diamond, J., 1986. Laboratory experiments, field experiments, and natural experiments. In: Diamond, J., Case, T.J. (Eds.), *Community Ecology*. Harper & Row Publishers, New York, NY, pp. 3–22.
- Domínguez, J., Bohlen, P.J., Parmelee, R.W., 2004. Earthworms increase nitrogen leaching to greater soil depths in row crop agroecosystems. *Ecosystems* 7, 672–685.
- Forey, E., Barot, S., Decaëns, T., Langlois, E., Laossi, K.-R., Margerie, P., Scheu, S., Eisenhauer, N., 2011. Importance of earthworm–seed interactions for the composition and structure of plant communities: a review. *Acta Oecol.* 37, 594–603.
- Gates, G.E., 1970. *Miscellanea megadrilologica VII. Megadrilologica* 1, 1–14.
- Grant, J.D., 1983. The activities of earthworms and the fates of seeds. In: Satchell, J.E. (Ed.), *Earthworm Ecology: From Darwin to Vermiculture*. Chapman & Hall, London, pp. 107–122.
- Haimi, J., Huhta, V., Boucelham, M., 1992. Growth increase of birch seedlings under the influence of earthworms – a laboratory study. *Soil Biol. Biochem.* 24, 1525–1528.

- Hale, C.M., 2008. Evidence for human-mediated dispersal of exotic earthworms: support for exploring strategies to limit further spread. *Mol. Ecol.* 17, 1165–1169.
- Hendrix P.F., Bohlen P.J., 2002. Exotic earthworm invasions of North America: ecological and policy implications. *Bioscience* 52, 801–811.
- Holdsworth, A.R., Frelich, L.E., Reich, P.B., 2007. Effects of earthworm invasion on plant species richness in northern hardwood forests. *Conserv. Biol.* 21, 997–1008.
- Keller, R.P., Cox, A.N., Van Loon, C., Lodge, D.M., Herborg, L.-M., Rohlisberger, J., 2007. From bait shops to the forest floor: earthworm use and disposal by anglers. *Am. Midl. Nat.* 158, 321–328.
- Kernecker, M. 2013. The Functional Role of Earthworms in Carbon and Nitrogen Dynamics in Riparian Areas Under Different Land Use in Southern Québec. In: Ph.D. Thesis, Dept. Nat. Res. Sci., McGill University, Montreal, QC.
- Lawrence, B., Fisk, M.C., Fahey, T.J., Suárez, E.R., 2003. Influence of nonnative earthworms on mycorrhizal colonization of sugar maple (*Acer saccharum*). *New Phytol.* 157, 145–153.
- Leckie, S., Vellend, M., Bell, G., Waterway, M.J., Lechowicz, M.J., 2000. The seed bank in an old-growth, temperate deciduous forest. *Can. J. Bot.* 78, 181–192.
- Milcu, A., Schumacher, J., Scheu, S., 2006. Earthworms (*Lumbricus terrestris*) affect plant recruitment and microhabitat heterogeneity. *Funct. Ecol.* 20, 261–268.
- Ramsay, J.A., Hill, S., 1978. Earthworms: the agriculturalist's friends. *Macdonald J.* 39, 6–8.
- Reynolds, J.W., Reynolds, K.W., 1992. Les vers de terre (Oligochaeta: *Lumbricidae* et *Sparganophilidae*) sur la rive nord du Saint-Laurent (Québec). *Megadrilogica* 4, 145–161.
- Tomati, U., Grappelli, A., Galli, E. 1988. The hormone-like effect of earthworm casts on plant growth. *Biol. Fertil. Soils* 5, 288–294.
- Westernacher, E., Graff, O. 1987. Orientation behaviour of earthworms (*Lumbricidae*) towards different crops. *Biol. Fertil. Soils* 3: 131–133.

CHAPITRE III

EXOTIC EARTHWORMS AFFECT PLANT RECRUITMENT AND SOIL MICROBIAL COMMUNITIES IN NORTHERN HARDWOOD FORESTS (QUEBEC, CANADA)

Mise en contexte

Une récente recherche en microcosme (Chapitre II) a mis en lumière le potentiel des vers de terre de l'espèce *L. terrestris* à affecter négativement les taux de germination et la survie des plantules de différentes espèces d'arbres forestiers indigènes à la province de Québec, Canada. Leur propagation ainsi que celle d'autres espèces de vers de terre, dans des sols forestiers des érablières de la province pourrait causer une perte de l'intégrité des milieux naturels, et potentiellement affecter négativement le recrutement de l'érable à sucre, une espèce à haute valeur commerciale. Puisque la recherche effectuée en microcosme se voulait une façon d'obtenir des pistes sur les mécanismes par lesquels les vers de terre affectent le recrutement en forêt, nous avons poursuivi la recherche dans le milieu naturel, dans le cadre d'un deuxième volet faisant partie du même projet. Nous avons sélectionné 5 secteurs de la région de l'Estrie, dans lesquels nous avons identifié 40 érablières à tilleul, où nous avons quantifié la fréquence d'occurrence des vers de terre (EW-FO), les propriétés du sol, la végétation et la flore microbienne. À notre connaissance, aucune recherche du même genre n'avait encore eu lieu dans des érablières de la province de Québec. Nos résultats suggèrent que l'invasion des vers de terre dans ce type d'écosystème forestier aura le potentiel d'influencer le recrutement de certaines espèces, de modifier des propriétés physico-chimiques du sol et d'affecter la flore microbienne.

Le manuscrit qui suit sera sous peu soumis au périodique *Écoscience* en vue d'une révision par les pairs, en prévision d'une publication. Comme dans le cadre de l'article figurant au chapitre II, la première auteure de l'article, Mélanie Drouin, réalisa le protocole, la prise de données, les analyses statistiques et la rédaction, sous la supervision de son directeur de recherche, le professeur Robert Bradley (Université de Sherbrooke), ainsi que de sa co-directrice, la professeure Line Lapointe (Université Laval). La quatrième auteure de l'article

est la Dr. Joann Whalen (Université McGill) qui a participé à l'élaboration des idées constituant le projet et qui a rédigé la demande de subvention au Fonds québécois de la recherche sur la nature et les technologies (FQRNT), nous permettant d'obtenir le financement requis pour réaliser le projet.

**EXOTIC EARTHWORMS AFFECT PLANT RECRUITMENT AND SOIL
MICROBIAL COMMUNITIES IN NORTHERN HARDWOOD FORESTS (QUEBEC,
CANADA)**

Mélanie Drouin^a, Robert Bradley^{a,*}, Line Lapointe^b, Joann Whalen^c

^aDépartement de biologie, Université de Sherbrooke., 2500 boul. de l'Université, Sherbrooke,
Québec, J1K 2R1, Canada

^bDépartement de biologie, Université Laval, 2325 rue de l'Université, Ste-Foy, Québec, G1V
14 0A6, Canada

^cDepartment of Natural Resource Sciences, Macdonald Campus of McGill University, 21111
Lakeshore Road, Ste-Anne de Bellevue, Québec, H9X 3V9, Canada

*Corresponding author. Tel.: +1 819 821 8000, Fax. 62080; fax: +1 819 821 8049,
E-mail address: Robert.Bradley@USherbrooke.ca

Keywords

Sugar Maple stands, arbuscular mycorrhizal fungi, diversity index, forest floor thickness, soil pH, C:N ratio

Abstract

Evidence of the severe effects of exotic earthworms on the integrity of northern temperate forest systems have been reported in recent studies. Since the presence of exotic earthworms has been observed in Sugar Maple-Basswood stands of the Eastern Townships, in southeastern Quebec, we conducted an observational study in 40 plots located in 5 Sugar Maple-Basswood stands of the area. The main objective of this research was to provide additional evidence on the impacts of invasive earthworms on the integrity of the natural habitat, and our second objective was to test whether the earthworm frequency of occurrence (EW-FO) had a significant effect on plant recruitment. Our results showed that the EW-FO has a significant impact on soil pH, on C:N ratio and on forest floor thickness, as well as on species richness and evenness. The abundance of 7 out of 17 plant species was significantly affected by the EW-FO, and the results of redundancy analyses show that EW-FO, soil pH and forest floor thickness significantly affected the distribution of many understory plant species. Moreover, the same variables also had a significant effect on the biomass of selected microbial groups. We conclude that earthworms have the potential to affect the ecological integrity of Sugar Maple-Basswood stands of southern Quebec, and that their effect on the recruitment of certain species will be both direct and indirect.

Introduction

In southern Quebec (Canada), it has been established that native earthworm species did not survive the Wisconsin glaciation, which ended over 11 000 years ago (Gates, 1970; James, 1995). Accordingly, 17 of the 19 known earthworm species in southern Quebec were introduced in recent centuries by European settlers (Addison, 2009). Given that their natural rate of spread is no more than 5 to 10 m yr⁻¹ (Marinissen & van den Bosch, 1992), and given that they are predominantly found in agricultural fields, along roads and near fishing lakes, earthworm dispersal throughout the landscape is likely mediated mainly by human activities (Gundale et al., 2005; Keller et al., 2005; Tiunov et al., 2006; Holdsworth et al., 2007b; Cameron & Bayne, 2009). In northern temperate forest ecosystems similar to those found in southern Quebec, recent studies have revealed severe effects of exotic earthworms on the integrity of natural forests (e.g., Hale et al., 2006; Corio et al., 2009), which has prompted others to reflect on the need for land management policies that could mitigate earthworm dispersal (e.g., Callahan et al., 2006; Hale, 2008). Before policy makers in southern Quebec can engage in such a dialogue, empirical evidence is required that shows an irregular occurrence of exotic earthworms in forest ecosystems, as well as their impacts on vegetation and soil properties.

The introduction of exotic earthworm species into previously earthworm-free northern temperate forest soils, such as in northern Minnesota and Wisconsin, was shown to increase the abundance of some plant species, and decrease the abundance of others, resulting in an overall net reduction of understory plant diversity (Gundale, 2002; Hale et al., 2006; Holdsworth et al., 2007a; Corio et al., 2009). It has been hypothesized that the potential loss of understory plant diversity may result from various mechanisms. A few manipulative studies have shown, for example, that comminuting and soil mixing activities of earthworms might have a direct effect on seed germination (Milcu et al., 2006; Aira & Pearce, 2009; Eisenhauer et al., 2010) or seedling survival (Eisenhauer et al., 2010; Drouin et al., submitted). Earthworms could also have indirect effects on the performance of understory plant species, by modifying the physico-chemical and biological properties of surface soil in

which plant roots thrive. For example, Shipley et al. (Pers. comm.) recently described the rooting habits of 20 forest understory herbaceous plant species in southern Quebec and found that only 4 of these species rooted in the mineral soil, while the rest rooted in the organic forest floor. Given that earthworms may reduce or eliminate organic forest floors (Hale et al., 2006; Gundale et al., 2005), they might by the same token decrease the competitive abilities of some understory plant species. Moreover, as discussed by Corio et al. (2009), it is possible that the removal of the forest floor could increase evaporation and increase moisture loss in the upper layers of the mineral soil, which could negatively affect the recruitment of plants with shallow root systems. Another example of how earthworms might indirectly affect understory plant species is by modifying the structure of soil microbial communities. For example, Lawrence et al. (2003) reported a negative effect of earthworms on the colonization of Sugar Maple (*Acer saccharum* Marsh.) roots by beneficial arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). Finally, it was shown that earthworms may reduce the availability of nitrate, ammonium, and phosphate (Hale et al., 2005b), as well as certain groups of soil fauna (Eisenhauer et al., 2007; Snyder et al., 2011), all of which could also reduce the performance of certain understory plants.

Two experimental approaches have so far been used to reveal the ecological impacts of exotic earthworms. Some studies have resorted to an intensive sampling of vegetation and/or soil properties across a small number of earthworm invasion fronts (e.g., Bohlen et al., 2004; Hale et al., 2006), while others have opted for an extensive sampling of fewer variables across a larger number of independent forest plots (e.g., Holdsworth et al., 2007a; Corio et al., 2009). With the first approach, sampling plots within a site are assumed to be similar in every aspect except for the presence or abundance of earthworms. Results are, therefore, precise at the local scale, but may not necessarily be consistent across sampling locations. For example, Hale et al. (2006) found that exotic earthworms had a negative effect on herbaceous plant species richness on 2 intensively studied sites, a positive effect on species richness on a 3rd site, and no effect on a 4th site. With the second approach, the use of many widely spaced forest plots introduces many random effects, such as differences in the regional pool of species, in the age of the forest or in land use history. If it is, however, still

possible to observe significant ecological trends that are attributable to earthworms amidst this noise, then this second approach may be more useful than the first in generalizing conclusions at regional scales and influencing future policies.

In order to increase the likelihood of observing significant ecological trends that are attributable to earthworms using an extensive sampling design, we should reduce inter-plot variability by selecting a common forest type and forest age, with common understory species. The Sugar Maple-Basswood (*Tilia americana* L.) forest type is found throughout the St. Lawrence Lowlands and in most of the geographic area between the St. Lawrence River and Vermont, which makes it one of the most abundant forest types in the southern part of the province of Quebec. Moreover, its leading tree species, *A. saccharum*, holds a high economic value because of its timber, its fibre and for the production of maple syrup. Recent studies have reported negative effects of exotic earthworms on the recruitment of *A. saccharum* in the understory (Hale et al., 2006; Holdsworth et al., 2007a; Corio et al., 2009), and these same studies also found a higher recruitment of various *Fraxinus* spp. and *Carex* spp., which are also abundant in Sugar Maple-Basswood stands of southern Quebec. Thus, mature Sugar Maple-Basswood stands with similar understory species would be a sensible choice of forest type for conducting the first regional survey on the ecological impacts of exotic earthworms in southern Quebec. We report on a study that was designed under the objective of confirming that earthworms are not ubiquitous across mature Sugar Maple-Basswood stands. Also, our second specific objective was to test whether the EW-FO correlated with changes in the relative abundance of various understory plant species, and in an overall net reduction of understory plant diversity. Our third specific objective was to explore possible relationships between soil physico-chemical and microbial properties that might explain earthworm-mediated changes in understory plant communities. Our main longer-term objective was to document and quantify the impacts of exotic earthworms on the integrity of natural forests in southern Quebec, which would foster constructive dialogue regarding the possible need for land management policies to mitigate earthworm dispersal in the province.

Materials and methods

Study area, experimental design and field sampling

The Eastern Townships (10 508 km²) in southeastern Quebec (Canada), lies within the Sugar Maple-Basswood biogeoclimatic zone (Gosselin, 2007). Mean annual rainfall and temperature for the region, based on 30-year running averages for the City of Sherbrooke, are respectively 1144 mm and 4.1 °C (Environment Canada, 2013). In September 2010, a total of 40 sampling plots (9 m²) were established across 5 sites within the region (Figure 1). Two of these sites, each comprising 10 plots, were 11 km apart on land owned by Domtar (a pulp and paper company) and located northeast of the town of Windsor. Two other sites, each comprising 5 plots, were located 8 km apart within the *Parc National du Mont-Orford*, which is 5 km north of the City of Magog. The fifth site was *Mont-Bellevue*, a municipal nature reserve in the City of Sherbrooke. The distance between sampling plots within each area varied between 100 and 1,000 m.

Each sampling plot was established in a deciduous forest dominated by mature *A. saccharum* with common understory species. In September 2010, 3 parallel transects were established 1.5 m apart from one another. Fresh litter and woody debris were removed and 4 soil cores (7.5 cm dia., 30 cm depth) were sampled at 1 m intervals along each transect. The depth of the forest floor F horizon (Soil Classification Working Group, 1998) in each core was measured, and the values were used to calculate the average depth for each plot. Each soil core was then placed in a plastic bucket and dissected by hand to ascertain the presence or absence of earthworms (at least one individual). Each soil core was then placed in a plastic bucket and dissected by hand to ascertain the presence or absence of earthworms (at least one individual). The same earthworm sampling scheme was repeated in late June 2011, using 3 parallel transects that were established at 75 cm distance from the transects used in the previous year. The relative abundance of earthworms in each plot was based on the total number of cores, with the 2 sampling dates combined (maximum core number/plot = 24), where at least one earthworm was detected.

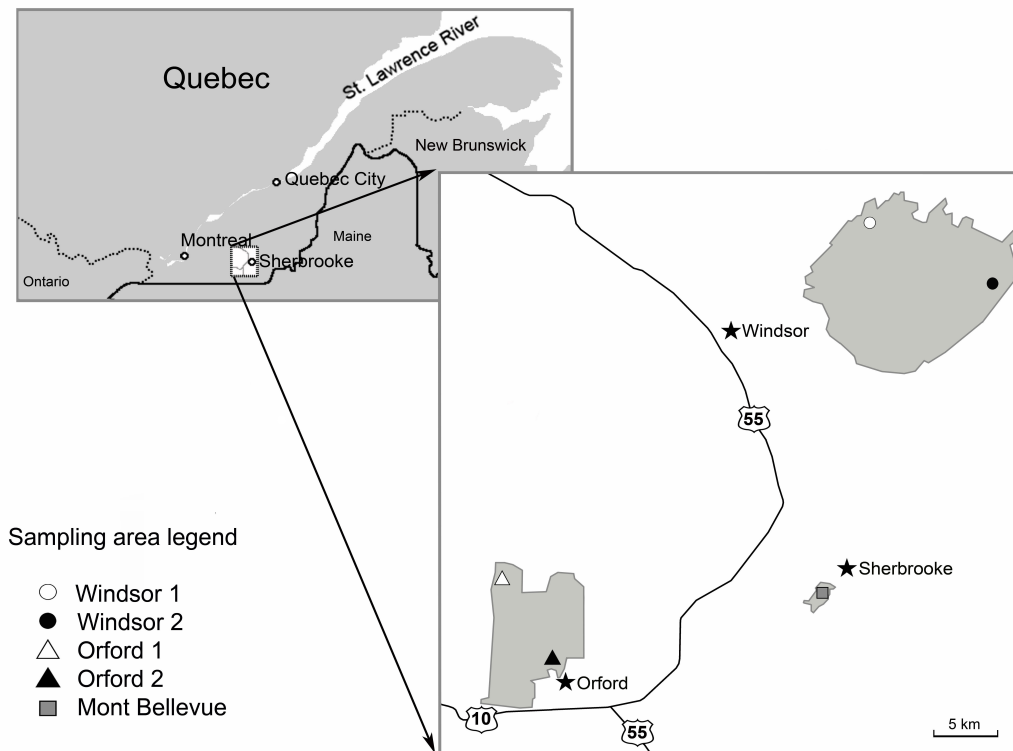


Figure 1. Sampling areas, located in three forests of the Eastern Townships. Shaded areas represent the total superficies of each forest: Domtar-owned land (Windsor 1 and 2), *Parc National du Mont-Orford* (Orford 1 and 2) and *Mont Bellevue*.

In early June 2011, the understory vegetation present within each earthworm sampling area was surveyed using the line-intercept method (Kent and Coker, 1992). Stakes were driven into the soil at the 4 corners of each 3 m x 3 m sampling area, and at 1 m intervals between the 4 corner stakes. Twine was strung across opposing stakes and all understory plants, including juvenile trees < 5 cm stem dia., which intersected the twine along its whole length were noted. To account for plant species that might only appear later in the summer, an identical survey was conducted in late August 2011. Most species were recorded on both dates, and their abundance values were thus averaged over both sampling dates. For the few species that were recorded on a single date, the abundance value for that single date was used.

Following the first earthworm survey in September 2010, all soil cores within each plot were pooled, earthworms and other visible fauna were removed, the soil was homogenized by

hand, and a 500 g subsample was kept under ice packs in a cooler. These 40 bulk soil samples were transported to the University of Sherbrooke, where they were sieved to pass a 5 mm mesh and stored at 4 °C until their physico-chemical properties could be analyzed. A soil subsample (ca. 20 g) from each plot was immediately frozen until analyzed for its fatty acid profile. Other data that were gathered on this date included an estimate of tree basal area using a 2-factor wedge prism, together with soil drainage class according to the criteria developed by the Expert Committee on Soil Survey (1982).

In October 2012, a final visit was made to each plot to collect earthworm specimens for identification purposes. We applied a dry mustard solution (25 g L⁻¹) over each plot to expel earthworms from the soil (Gunn, 1992; Lawrence & Bowers, 2002). The specimens were preserved in aqueous 90% ethanol and brought back to the laboratory. Sexually mature individuals were identified morphologically using Reynolds' (1976) identification key.

Soil physico-chemical properties

For each of the 40 sampling plots, soil pH was measured electrometrically on 1:5 soil:water slurries. Total C and N were measured by high temperature combustion followed by thermo-conductometric detection, using a Vario Macro elemental analyzer (Elementar Analysensysteme GmbH, Hanau, Germany). A 100 g soil subsample was ashed at 550 °C for 16 hours in a muffle furnace for the determination of soil organic matter (LOI, loss-on-ignition method), and the textural class of the remaining mineral soil was determined by particle-size analysis using the hydrometer method (Bouyoucos, 1962). Mehlich-extractable base cations (Na, Ca, Mg, K) were analyzed by atomic absorption spectroscopy (AAAnalyst 100, Perkin-Elmer Corp., Waltham, MA), whereas Mehlich-P (Mehlich, 1984) was analyzed colorimetrically (882 nm absorbance; Murphy & Riley, 1962) with a Spectro 1200 spectrophotometer (UNICO Corp., Princeton, NJ). Fresh soil subsamples (15–20 g) were extracted with 100 mL of 1.0 N KCl, and the filtered extracts were analyzed colorimetrically for NH₄⁺ and NO₃⁻ on a Technicon II autoanalyzer using the Berthelot and Griess-Ilosvay

methods (Mulvaney, 1996), respectively. The sum of cation charges (cmolc kg⁻¹) that corresponded to Na⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, K⁺, and NH₄⁺ concentrations, together with exchangeable acidity, was used as a proxy for cation exchange capacity (CEC).

Soil microbial community structure

Soil microbial community structure in each plot was determined from phospholipid fatty acid (PLFA) and neutral lipid fatty acid (NLFA) profiles, using the procedure described in detail by Hamel et al. (2006). PLFA and NLFA concentrations were estimated from the detection of methylated 19:0 FA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), which was introduced as an internal standard. Concentrated PLFA and NLFA extracts were dissolved in hexane and injected into a HP 6890 gas chromatograph equipped with a flame ionization detector (300 °C), a 30-m Restek Rtx-1 column, and He as carrier gas. Microbial community structure was based on the FA nomenclature that was proposed by Ratledge and Wilkinson (1988). Peaks of interest were identified, based on the retention times of 41 FA standards (Supelco Bacterial Acid Methyl Ester Mix 47080-U, Sigma-Aldrich). The abundance of these FAs was estimated from the area under each peak relative to the area below the 19:0 peak, which was calibrated according to a standard curve made from 19:0 FA standards. FA 18:2 ω 6c was ascribed to fungal biomass (Frostegård & Bååth, 1996). FAs i14:0, i15:0, a15:0, i16:0, i17:0, a17:0, 10me16:0, 10me18:0, br17:0, br18:0 were ascribed to Gram⁺ bacteria (Ratledge & Wilkinson, 1988; Zelles, 1999), while FAs cy17:0, cy19:0, 16:1 ω 7c, 16:1 ω 7t, 16:1 ω 9, 18:1 ω 7 were ascribed to Gram⁻ bacteria (Ratledge & Wilkinson, 1988; Zelles, 1999). Total bacterial biomass was calculated as the sum of Gram⁺ and Gram⁻ bacteria, plus fatty acid 17:0 (Harwood & Russell, 1984). FAs 16:1 ω 5 and 10Me18:0 were respectively ascribed to arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) (Madan et al. 2002) and to actinomycetes (Frostegård et al., 1993) even though actinomycetes were also included in the calculation of the Gram⁺ bacteria biomass.

Statistical analyses

Simple linear regressions were used to test the effects of the EW-FO on soil and site properties, on understory plant species richness and evenness, and on Shannon diversity (Magurran, 1988). Our analyses included only those plant species that occurred in all 5 sampling areas and which were present in at least 2 plots per sampling area. Our analyses thus included 17 species or species groups, *A. saccharum*, *Acer pensylvanicum* L., *Acer rubrum* L., *Arisaema triphyllum* (L.) Schott, *Athyrium filix-femina* (L.) Roth, *Betula alleghaniensis* Britt., *Cystopteris fragilis* (L.) Bernh., *Dryopteris intermedia* (Mull. ex Willd.) A. Gray, *Fagus grandifolia* Ehrh., *Fraxinus* spp., *Maianthemum canadense* Desf., *Prunus serotina* Ehrh., *Rubus idaeus* L., *Sambucus canadensis* L., *Thelypteris noveboracensis* (L.) Nieuwl., *Trillium erectum* L., and graminoid species. Linear regressions were also used to test the effect of the EW-FO on each individual plant species. The validity of all these regressions depended on an adequate distribution of the EW-FO among our sampling sites, to separate the effect of sampling area from that of earthworms on plant communities. Given that earthworms were absent in 15 of the 20 plots that were located in Windsor 1 and 2 sampling sites, all significant regressions that were obtained using all 40 plots were retested using only the 20 plots from Orford 1 and 2, as well as Mont Bellevue sampling sites.

Redundancy analysis (RDA; Borcard et al., 2011) was used to explore inter-set correlations between soil and site properties (i.e., environmental data matrix, including the EW-FO) and the abundance of 17 selected plant species (i.e., plant community response matrix), together with intra-set correlations within these two matrices. We first looked for apparent collinearity among physico-chemical variables, by running multiple regressions in the R statistical environment (Version 2.14.0), which led us to exclude percent silt (correlated with percent sand) and total base cations (correlated with CEC). Total-N, NH_4^+ -N and NO_3^- -N concentrations were replaced by the ratios of (NH_4^+ -N:total-N) and (NO_3^- -N:total-N). We removed extractable-P since the measured concentrations of this soil nutrient were low ($< 5 \text{ mg kg}^{-1}$). The soil data then were normalized, given that different units and scales were employed for each measurement. Because of the frequent occurrence of zero values, we

executed a Hellinger transformation on the plant data matrix, which consisted in dividing the abundance values by the site abundance, and then to squareroot-transform the result. This transformation gave proportionate weight to the rarer plant species (Legendre & Gallagher, 2001). A second RDA was performed after sorting the 17 selected plant species into 5 functional groups (tree seedlings, shrubs, ferns, graminoids, broadleaf herbs), in order to see if the new RDA would yield the same relations once the species with common characteristics were grouped together as independent variables. Both RDAs were followed by Parsimonious RDA Analysis (Borcard et al., 2011), which extracted the percentage variation that was explained solely by the significant environmental variables. For each parsimonious RDA, we estimated variance inflation factors (VIF; Borcard et al., 2011) based on a $VIF < 5$ threshold for the individual predictor variables as indicators of the severity of multicollinearity.

To explore possible correlations between environmental variables and soil microbial community structure, we performed 2 more RDAs using NLFA or PLFA biomasses as the response data matrices (not shown). Again, these 2 RDAs were followed by Parsimonious RDA analysis. Based on the results of RDA analyses, the effects of earthworms, forest floor depth, and soil pH on selected microbial groups were tested by simple linear regressions.

All statistical analyses were performed using the vegan package (Oksanen et al. 2011) in the R statistical environment (Version 2.14.0).

Results

A total of 7 earthworm species could be identified in the plots, viz., *Allobophora chlorotica* Savigny, *Aporrectodea rosea* Savigny, *Aporrectodea turgida* Eisen, *Dendrobaena octaedra* Savigny, *Lumbricus rubellus* Hoffmeister, *Lumbricus terrestris* L. and *Octolasion tyrtaneum* Savigny. No earthworms were observed in Orford 1 sampling site. A single species of epigeic earthworm, *D. octaedra*, was observed in Windsor 1 and 2 sampling sites, whereas Mont Bellevue and Orford 2 sampling sites had the most complex species assemblages, in

which epigeic, endogeic and anecic earthworms were identified. Most of our plots in Mont Bellevue contained only one or two species at once, but up to 4 species could be found in a single plot in Orford 2.

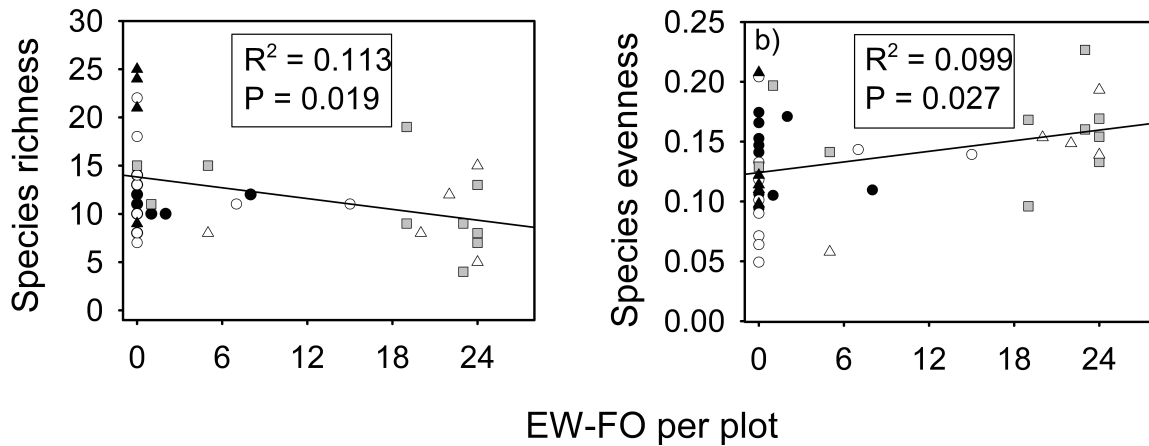


Figure 2. Influence of the EW-FO on species richness and evenness within each of the 40 plots. The EW-FO is based on the number of cores ($n = 24$) where earthworms were observed, within each of the 40 plots. See Figure 1 for symbol description.

Shannon diversity did not vary with earthworm densities ($R^2 = 0.009$, $P = 0.25$). However, species richness decreased and evenness increased as the EW-FO increased (Figure 2). The EW-FO had a significant effect on 7 of 17 species or species groups (Figure 3). Of these species, *A. pensylvanicum*, *A. rubrum*, *C. fragilis*, *D. intermedia*, and *F. grandifolia* decreased as the EW-FO increased. In contrast, the densities of *Fraxinus* spp. and graminoids increased with the EW-FO. When we excluded the plots from Windsor 1 and 2 where earthworms were seldom encountered, the same relationships persisted, except for *F. grandifolia* and graminoids, where the effect of the EW-FO were no longer statistically significant. Two other plant species exhibited negative responses with increasing earthworm densities: *B. alleghaniensis* ($R^2 = 0.191$, $P = 0.031$) and *M. canadense* ($R^2 = 0.321$, $P = 0.005$). *A. saccharum* densities did not correlate with earthworm densities ($R^2 = 0.011$, $P = 0.39$).

Physico-chemical properties of the 40 plots are summarized in Table 1. Means and ranges are typical of values that would be expected in Sugar Maple stands, except for phosphorus, for

which we only found negligible concentrations (not shown). The median value for the EW-FO which we only found negligible concentrations (not shown). The median value for the EW-FO was zero, and the standard deviations for this variable and for Mg and K were fairly high. When analyzed in linear regressions with earthworm densities, only 3 physico-chemical variables yielded significant relationships (Table 1): pH increased with EW-FO, whereas C:N ratio and forest floor thickness were both negatively affected by earthworms. NH_4^+/N and NO_3^-/N ratios were not affected by the EW-FO in these soils.

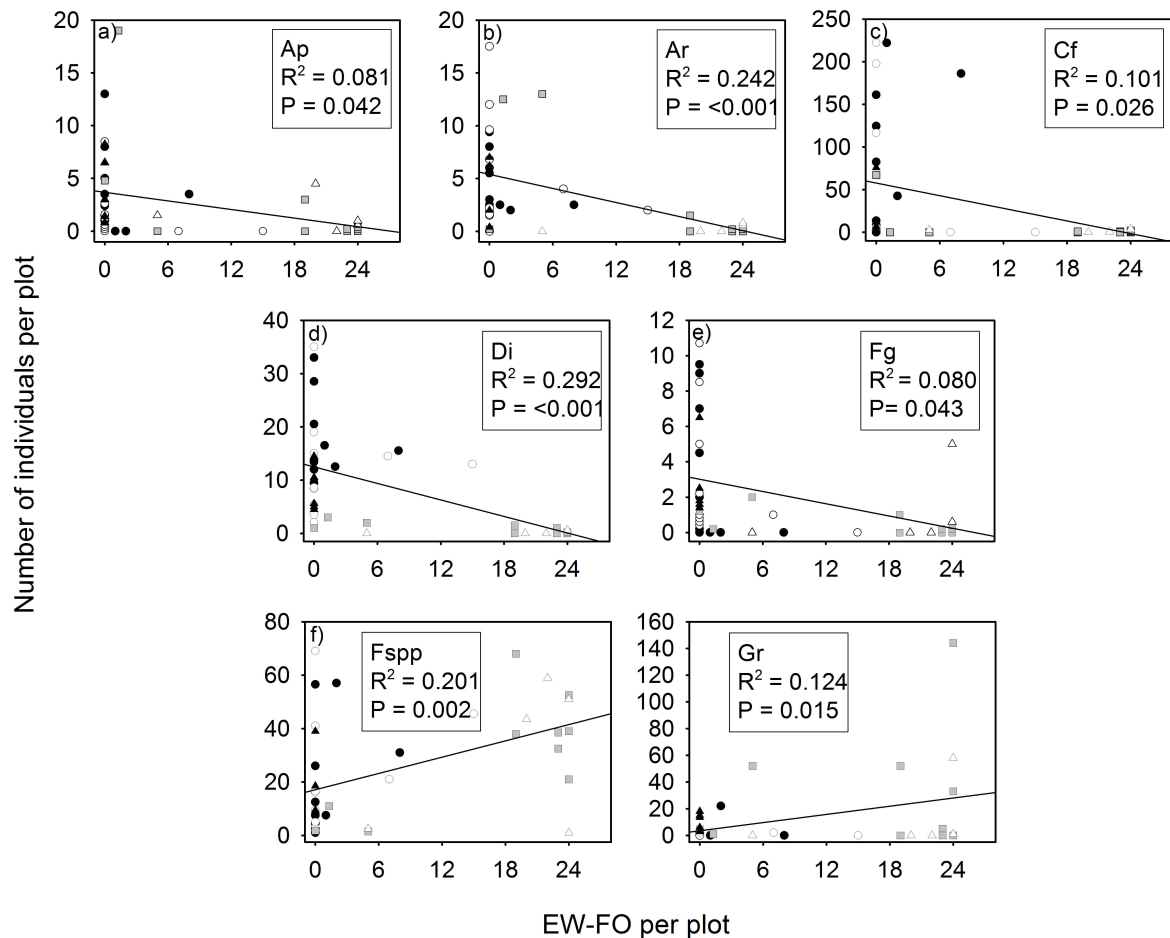


Figure 3. Influence of the EW-FO on the number of plants per plot for seven plant species (or groups of species). The species shown here were seen on at least 15 of the 40 plots, and were present in the three sampling areas. The EW-FO is based on the number of cores ($n = 24$) where earthworms were observed, within each of the 40 plots. The plant species are abbreviated to the first letter of their genus and species: *Acer pensylvanicum* (Ap), *Acer rubrum* (Ar); *Cystopteris fragilis* (Cf); *Dryopteris intermedia* (Di); *Fagus grandifolia* (Fg); *Fraxinus* spp. (F spp); Graminoids (Gr). See Figure 1 for symbol description.

Physico-chemical properties of the 40 plots are summarized in Table 1. Means and ranges are typical of values that would be expected in Sugar Maple stands, except for phosphorus, for which we only found negligible concentrations (not shown). The median value for the EW-FO was zero, and the standard deviations for this variable and for Mg and K were fairly high. When analyzed in linear regressions with earthworm densities, only 3 physico-chemical variables yielded significant relationships (Table 1): pH increased with EW-FO, whereas C:N ratio and forest floor thickness were both negatively affected by earthworms. NH_4^+/N and NO_3^-/N ratios were not affected by the EW-FO in these soils.

According to the RDA that involved the individual plant species (Figure 4a), the soil variables explained 54.8% of the variance in the plant species abundance. The first and second ordination axes collectively explained 32.2% of that variance. As shown in the table included in Figure 4a, three significant independent variables ($\text{VIF} \leq 1.2$) accounted for the distribution of the variance in the plant species abundance. The first was the EW-FO, followed by soil pH and the ratio of NH_4^+ to total N. Of the plant species that were included in this RDA, *C. fragilis* appeared to be the most negatively affected by the presence of earthworms and high pH. In contrast, some species such as *Fraxinus* spp. and *A. triphyllum* appeared to be positively affected. The parsimonious RDA (not shown) that used only these three explanatory variables showed that they collectively explained 29.1% of the variation in plant species abundances. The RDA using species grouped into functional groups (Figure 4b) explained 53.0% of the variance in the abundance of the functional groups. The first and second axes alone accounted for 45.8% of that variance. Only two independent variables ($\text{VIF} = 1.2$) accounted for the variance in the functional groups, i.e., forest floor thickness and soil pH, which explained 32.1% of the variance in the parsimonious RDA. Both RDAs clearly indicated that the EW-FO and litter thickness produced opposite effects with respect to plant abundance.

Table 1: Means, variances, minimum and maximum values of each soil physico-chemical property, as well as more general site properties. Linear regressions between the EW-FO and the different soil and site properties were also conducted. NA = Not applicable, SD = Standard deviation.

Variable	Median	Mean	SD	Min-max	Slope	Adj. R ²	P-value
Soil physico-chemical properties							
pH in water	4.83	4.96	0.59	4.12–6.35	0.020	0.087	0.036
% C	5.2	6.5	4.5	3.2–28.1	-0.106	0.030	0.150
% N	0.40	0.44	0.19	0.28–1.24	-0.002	-0.010	0.440
C:N ratio	13.3	14.0	2.4	10.7–22.7	-0.120	0.227	0.001
% clay	0.6	1.1	1.4	0.00–5.00	-0.017	-0.011	0.450
% sand	59.0	59.2	8.3	34.0–77.5	-0.237	0.057	0.075
Na (mg (100 g) ⁻¹)	4.8	5.9	3.1	2.6–17.1	0.020	-0.026	0.970
Ca (mg (100 g) ⁻¹)	39.3	45.5	13.1	33.5–73.5	0.143	-0.014	0.500
Mg (mg (100 g) ⁻¹)	42.6	82.8	114.7	13.4–610.8	0.017	-0.026	0.990
K (mg (100 g) ⁻¹)	8.0	26.8	56.0	1.9–295.4	-1.106	0.013	0.230
CEC (meq (100 g) ⁻¹)	6.8	10.1	10.6	3.2–55.4	-0.021	-0.026	0.900
NH ₄ ⁺ -N : Total-N ratio (%)	0.06	0.10	0.11	0.02–0.55	< 0.001	0.009	0.250
NO ₃ ⁻ -N : Total-N ratio (%)	0.42	0.49	0.50	0.00–2.25	< 0.001	-0.015	0.520
Site properties							
Drainage class (1 to 7)	NA	NA	NA	Poor–Rapid	0.012	0.000	0.320
Forest floor thickness (cm)	3.5	3.1	2.0	0.0–6.0	-0.172	0.720	< 0.001
Basal area (m ² ha ⁻¹)	26	26	6	10–42	0.049	-0.020	0.640
EW-FO (# of cores)	0	7	10	0–24	NA	NA	NA

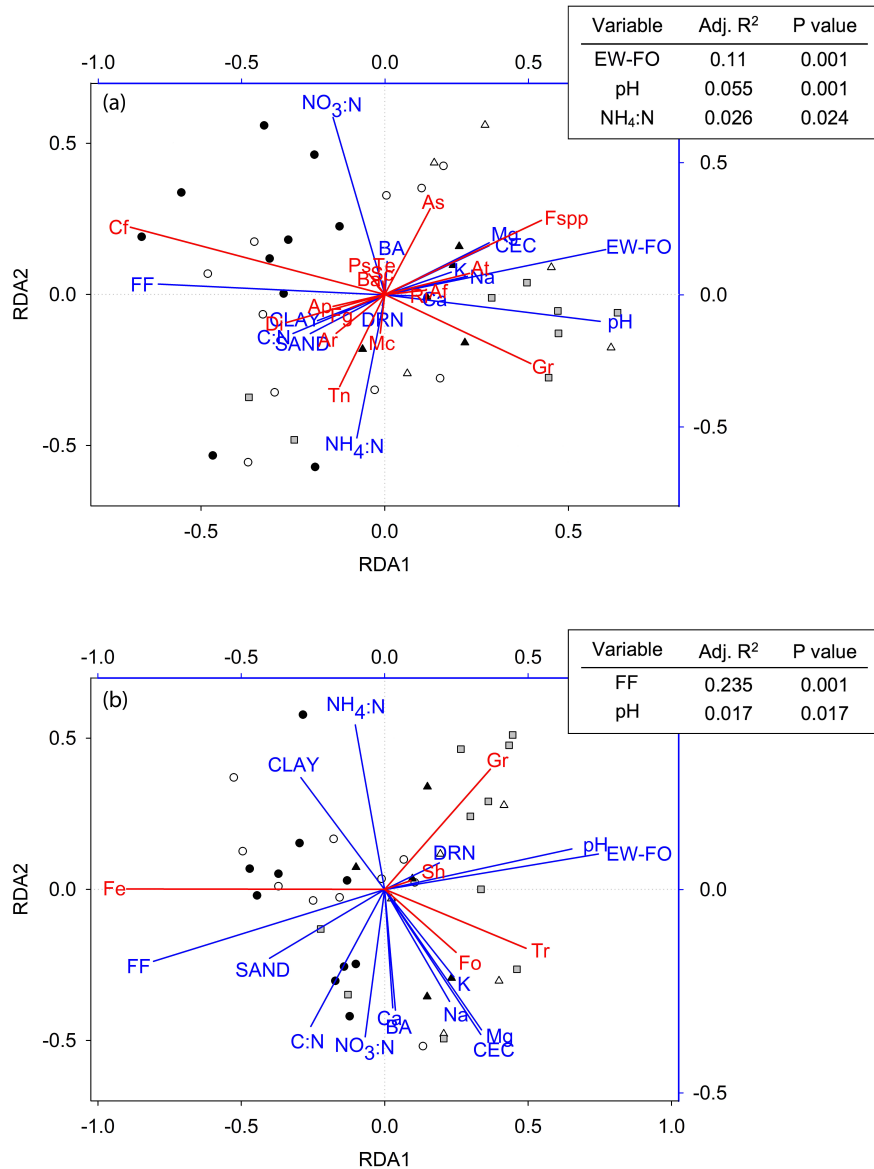


Figure 4. Results of the RDA analyses showing the sampling sites, the environmental variables as the independent matrix, and (A) the plant species and (B) the plant species classified in functional groups, as dependent matrices. The tables highlight the independent variables that significantly account for the variance in each RDA. *Acer pensylvanicum* (Ap), *Acer rubrum* (Ar), *Acer saccharum* (As), At, *Arisaema triphyllum* (At), *Athyrium filix-femina* (Af), *Betula alleghaniensis* (Ba), *Cystopteris fragilis* (Cf), *Dryopteris intermedia* (Di), *Fagus grandifolia* (Fg), *Fraxinus* spp. (Fsp), *Maianthemum canadense* (Mc), *Prunus serotina* (Ps), *Rubus idaeus* (Ri), *Sambucus canadensis* (Sc), *Thelypteris noveboracensis* (Tn), *Trillium erectum* (Te), ferns (Fe), graminoids (Gr), forbs (Fo), shrubs (Sh), trees (Tr), basal area (BA), cation exchange capacity (CEC), carbon to nitrogen ratio (C:N), calcium concentration (Ca), potassium concentration (K), magnesium concentration (Mg), sodium concentration (Na), drainage (DRN), earthworm frequency of occurrence (EW-FO), forest floor thickness (FF), ammonium to nitrogen ratio (NH₄:N), nitrate to nitrogen ratio (NO₃:N), percent clay (CLAY), percent sand (SAND). See Figure 1 for symbol descriptio

The results of the linear regressions involving the different lipid fractions relative to forest floor thickness and soil pH and EW-FO are shown in Table 2. These three variables were selected since they were shown to significantly influence the variance in plant species based on the results of RDA analyses. As estimated from the two lipid fractions (NLFA and PLFA), the relative abundances of the bacterial groups and fungi decreased with an increase in forest floor thickness. Consequently, the ratio of bacteria to fungi did not change with forest floor thickness. Linear regressions involving the lipid fractions of the different groups and soil pH yielded positive relationships for the two lipid fractions for gram+ bacteria, total bacteria and AMF, but only with PLFA fraction for gram- bacteria and actinomycetes. Again, linear regressions between soil pH and total fungi or bacteria to fungi ratios were not significant for either of the two lipid fractions. NLFAs of actinomycetes and PLFAs of AMF increased with earthworm densities, but the remaining groups exhibited no significant relationship with this variable.

Discussion

The earthworm species and densities that were reported in the present study reflected land use and accessibility of the different sites. Since it is assumed that earthworm transport and dispersal is mostly mediated by humans (Callaham et al., 2006), the absence of earthworms in Orford 1 was not surprising, given that these plots were located in a remote area, which was far from human habitation or trails. Windsor 1 and 2 sampling sites were located in a private forest, where there were few forest roads used mainly by hunters. There, we found a single epigeic earthworm species, *Dendrobaena octaedra*. In Minnesota, *D. octaedra* was also the first species to establish in forest sites, which supports the suggestion that epigeic earthworms are often at the leading edge of the invasion fronts (Addison, 2009). However, Hale et al. (2005a) have proposed that epigeic and epi-endogeic earthworms could facilitate the establishment of endogeic and anecic species, by altering the litter properties and starting its degradation. Their activity would make the organic material more accessible to other species, which in turn could lead to a permanent loss of the forest floor and to a drop in the

Table 2: Results of linear regressions testing effects of forest floor thickness (cm), soil pH and EW-FO (# soil cores) on 2 lipid fractions (NLFA = neutral lipid fatty acid; PLFA = phospholipid fatty acid) of various soil microbial groups (ng g⁻¹); NS = not significant.

Microbial group	Lipid fraction	Forest floor thickness			Soil pH			EW-FO		
		Slope	Adj. R ²	P-value	Slope	Adj. R ²	P-value	Slope	Adj. R ²	P-value
Gram +	NLFA	-21.2	0.199	0.023	81.0	0.260	< 0.001	NS	0.060	0.070
	PLFA	-53.2	0.133	0.012	222.5	0.220	0.002	NS	0.020	0.170
Gram -	NLFA	-33.1	0.084	0.039	NS	0.060	0.070	NS	0.020	0.210
	PLFA	-60.6	0.100	0.026	272.0	0.196	0.003	NS	0.030	0.160
Total bacteria	NLFA	-55.8	0.131	0.013	186.0	0.130	0.010	NS	0.030	0.130
	PLFA	-115.6	0.118	0.017	498.9	0.208	0.002	NS	0.027	0.160
Total fungi	NLFA	-16.0	0.080	0.043	NS	-0.020	0.580	NS	<0.001	0.320
	PLFA	NS	-0.006	0.390	NS	-0.020	0.780	NS	-0.020	0.620
Bacteria/fungi	NLFA	NS	0.007	0.270	NS	-0.020	0.630	NS	0.020	0.180
	PLFA	NS	-0.025	0.850	NS	0.003	0.300	NS	-0.010	0.450
Actinomycetes	NLFA	-2.5	0.129	0.013	NS	0.060	0.060	0.45	0.100	0.030
	PLFA	-5.2	0.072	0.052	18.2	0.080	0.044	NS	0.020	0.210
AMF	NLFA	-81.1	0.101	0.026	263.3	0.090	0.030	NS	0.020	0.180
	PLFA	-10.1	0.173	0.004	37.2	0.211	0.002	1.68	0.110	0.020

recruitment of certain plant species (Hale et al., 2005a). The most complex earthworm species assemblages were located in Orford 2 and Mont Bellevue, which contained earthworms belonging to all three categories. These sites were most accessible to public visitors, and located near hiking trails in public areas of Parc du Mont Bellevue and Parc du Mont Orford. In Orford 2, which was located close to a lake, we often found 3, and up to 4 earthworm species within a single plot. Their presence was consistent with the use of earthworms as live fishing bait, which facilitates their dispersal into natural forest systems (Cameron et al., 2007).

Our results clearly showed that the presence of earthworms is associated with changes in the structure of plant communities of Sugar Maple-Basswood stands in southern Quebec, although their effects were variable among plant species. Invasion fronts have been observed in many forested areas throughout eastern North America and there is accumulating evidence that the presence of exotic earthworms in natural settings is associated with profound changes in the habitats (Hale et al., 2006; Cameron & Bayne, 2009; Corio et al., 2009). Plant species richness decreased significantly in heavily invaded areas, even though species diversity did not differ. Hale et al. (2006) reported that the diversity of herbaceous species was negatively affected in sites with a substantial earthworm biomass and diversity. A reduction in species richness suggests that undisturbed and favoured species could take over niches left empty by the species that were affected by earthworms, which could cause a shift in species composition. We also observed a positive relation between plant species evenness and EW-FO. This response suggests that over time, exotic earthworm activities could lead to the disappearance of rare plant species. Such an outcome has already been observed in Minnesota, where *L. terrestris* was deemed responsible for the extirpation of a rare fern, *Botrychium mormo* (Gundale, 2002).

Hale et al. (2006) and Corio et al. (2009) reported declines in recruitment of *A. saccharum* in heavily invaded forest areas. In the present study, two *Acer* species declined in abundance in heavily invaded plots, but *A. saccharum* was apparently not affected by the presence of earthworms. In a previous greenhouse experiment, germination and survival of Sugar Maple

under high *L. terrestris* densities was not significantly different from that in microcosms containing no earthworms (Drouin et al., submitted). These divergent results might be related to differences in soil physico-chemical properties. For example, soils in Sugar Maple stands tend to be slightly more acidic in Quebec than in Ontario or in the northern United States (Patrick Cartier, For. Eng., Domtar, Pers. Comm.); earthworms could act differently upon certain plant species, depending on soil pH, although this response remains to be investigated.

Differential response of plant species to earthworm densities could be potentially linked to plant recruitment and, thus, to germination requirements. *A. saccharum* and *Fraxinus pennsylvanica* Marsh., the most common *Fraxinus* species encountered in our plots, germinate in early spring (Burns & Honkala, 1990), when the leaf litter of the previous year has not yet been dispatched by earthworms. A thick litter at the time of germination could protect the seeds from desiccation and granivores as suggested by (Hale et al., 2006), which could allow these species to maintain high germination rate even in the presence of earthworms. On the other hand, *A. pensylvanicum* and *F. grandifolia*, two negatively affected species, produce large seeds compared to many other tree species. According to Burns and Honkala (1990), *A. pensylvanicum* seeds will only germinate within the first year of their dissemination if they are buried in humus or soil. However, since the seeds of these two species are somewhat large, it is possible that their size prevents them from getting buried by earthworms as they remove the forest floor around them. Thus, these species could suffer from desiccation, which could hinder their germination, as was observed with other large seeded species in a microcosm experiment (Drouin et al., submitted). All four of the aforementioned tree species shed their seeds during autumn leaf fall, suggesting that the seeds are incorporated into the litter layer at the time of germination. *A. rubrum*, the tree species that was most negatively affected by earthworms, germinates after seed dissemination, which occurs from April to July (Burns & Honkala, 1990). In this specific case, seeds germinate while earthworm activity is likely to be relatively high. It has been shown that earthworms have the potential of consuming as much as 93.8% of the annual litter fall within 4 weeks (Knollenberg & Merritt, 1985). We have previously observed that

earthworms can actively bury seeds and seedlings of *A. rubrum* (Drouin et al., submitted). Further, Aira and Pearce (2009) have shown that deep seed burial prevents germination, which in turn can negatively affect the recruitment. Forest floor conditions could also explain the positive relationship that we observed between the EW-FO and graminoids, as these species are adapted to open area conditions where organic material tends to accumulate less, together with negative relationships with some wood ferns, which are shade-tolerant and usually grow in rich, moist forest floors.

The EW-FO was significantly correlated to three inter-related physico-chemical properties of the soil, viz., forest floor thickness, pH, and the C:N ratio. As previously mentioned, the effect of earthworm activity on reducing forest floor thickness appears to be an important factor for plant recruitment. We deliberately chose to sample the uppermost 30 cm of soil, including the F and H horizons, to target the processes that occur directly in the surroundings of the germinating seeds and fine roots of the seedlings. In areas without earthworms, the soil samples contained considerably greater quantities of organic matter relative to mineral soil, but organic matter was nearly absent in samples with greater earthworm densities, resulting in a lower C:N ratio, which indicated more rapid decomposition of the forest floor. Decaëns et al. (1999) reported similar results: higher C:N ratios were detected in pasture soils where protective metallic enclosures had been established, allowing organic material to build up in spite of the presence of earthworms. We observed a significant increase in soil pH as the EW-FO increased, which is consistent with the observations made by Haimi and Huhta (1990), Welke and Parkinson (2003) and Eisenhauer et al. (2007). Consumption of the forest floor reduces the abundance of acidic organic matter, which can result in higher pH in areas where earthworm communities have become established. Therefore, by facilitating litter decomposition, earthworms would likely be associated with an increase in soil pH, which influenced the distribution of plant species, based on the present results. It is expected that soil pH will also have a critical influence on earthworm establishment (Edwards & Bohlen, 1996), so we posit that pH and the EW-FO have the potential to affect each other.

It is clear that earthworms, through their negative effects on forest floor thickness, generated a cascade of changes in the first 30 cm of soil, which is a critical zone for root establishment. Surprisingly, earthworms had no significant effect on concentrations of NH_4^+ and NO_3^- in the soils, although the ratio of NH_4^+ to total N was a significant variable influencing the distribution of vegetation, according to RDA. We expected that the increased decomposition of organic matter by earthworm activity would result in higher concentrations of ammonium and nitrate, in turn giving support to the assumption that earthworms increase nutrient availability, but this relationship was not confirmed by the present results. Since earthworms can considerably increase nitrogen leaching (Domínguez et al., 2004), nutrients liberated by earthworm activity could have been washed away, thereby resulting in similar global concentrations relative to those recorded in plots without earthworms.

The aim of this research was not only to verify whether earthworms influence plant species diversity and abundance, but also to investigate their effects on the microbial biomass. Lawrence et al. (2003) noted a decrease in AMF root colonization in Sugar Maple within heavily invaded areas, suggesting that earthworms can limit root colonization rates in AMF-associated plants. We found the opposite response: The EW-FO appeared to favour AMF biomass. We did not directly analyze root colonization by AMF fungi, but PLFA and NLFA fractions of AMF should correlate with their biomass (Frostegård & Bååth, 1996). We thus used PLFA and NLFA fractions as proxies of potential root colonization by AMF. However, our sampling method did not allow us to separate the effect of the EW-FO from the effect of forest floor thickness on the abundance of AMF. Because we sampled the first 30 cm of soil in each plot, and the thickness of the F and H horizons varied with earthworm densities (0 to 6 cm; Table 1), AMF biomass in the samples is likely influenced by the ratio of organic matter and mineral soil in the samples. Many hardwood species of southern Quebec are associated with AMF, and because the possibility remains that earthworm activity could play a crucial role on the recruitment of these species, further research with consistent sampling quantities of organic or mineral soil would be needed to assess the influence of earthworm densities on AMF biomass in Sugar Maple-Basswood stands of the province of Quebec.

As expected, forest floor thickness was inversely proportional to bacterial biomass. On one hand, this supports the findings of Groffman et al. (2004), who suggested that the incorporation of organic material into the mineral horizons at higher earthworm densities tends to enhance microbial activity. On the other hand, based on the study of Bonkowski et al. (2000), we expected that selective grazing by earthworms and competition for availability of organic material in the upper horizons would negatively affect fungal communities. However, the effect of the EW-FO and pH on soil fungi were shown to be non-significant, whereas fungal biomass was negatively affected by forest floor thickness. This negative correction is surprising, considering that in absence of earthworms, fungi in the upper horizons slowly decompose organic material. These results once again point towards the activity of earthworms on the forest floor as the main factor influencing microbial biomass.

This study clearly demonstrated that earthworms have the potential to affect the abundance of certain plant species in Sugar Maple-Basswood stands in the Eastern Townships of Quebec. However, their main effect appears to be indirect, through their effects on the forest floor, which induces changes in both the above- and belowground communities. We reported significant changes in the recruitment of many plant species, and the biomass of some microbial groups as a function of the EW-FO, but forest floor thickness was correlated with a higher number of bacterial groups and with plant functional groups. The invasion of earthworms appears to be inducing a shift in the understory plant communities. Earthworms have been associated with predatory behavior on seeds and seedlings (Eisenhauer et al., 2010; Drouin et al., submitted) which directly affects the abundance of certain species, and the rapid consumption of organic material induces indirect impacts, such as an increase in soil pH, and a lower C:N ratio. *A. saccharum* is often reported as a species vulnerable to invasive earthworms. Although we did not observe any negative impacts on this species, two other *Acer* spp. were indeed negatively affected by the presence of dense earthworm communities. Differential results might be caused by differences in earthworm abundance or species assemblages in our plots compared to what has been observed in other researches. More Sugar Maple-Basswood stands in the Eastern Townships and in other regions in Southern Quebec should be monitored before drawing conclusions since studies in similar

ecosystems in Minnesota and Wisconsin have shown negative effects on *A. saccharum* recruitment (Hale et al., 2006; Corio et al., 2009). For now, many forested areas in the southern part of the province remain free of earthworms, despite their close proximity to agricultural lands and human activities. Under the Act Respecting Threatened or Vulnerable Species (MDDEFP, 2013), governmental authorities could take actions to preserve plant biodiversity and promote tree seedling recruitment. These actions could include efforts to raise public awareness, and adoption of policies regarding the sale of live earthworms as fishing bait, to limit further propagation of earthworms in natural habitats.

Acknowledgements

This study was made possible thanks to a “Team Grant” awarded by the Fonds québécois de la recherche sur la nature et les technologies.

Literature cited

- Addison, J.A., 2009. Distribution and impacts of invasive earthworms in Canadian forests ecosystems. *Biological Invasions*, 11: 59-79.
- Aira, M. & T. G. Pearce, 2009. The earthworm *Lumbricus terrestris* favours the establishment of *Lolium perenne* over *Agrostis capillaris* seedlings through seed consumption and burial. *Applied Soil Ecology*, 41, 360-363.
- Bohlen, P. J., P. M. Groffman, T. J. Fahey, M. C. Fisk, E. Suárez, D. M. Pelletier & R. T. Fahey, 2004. Ecosystem consequences of exotic earthworm invasion of north temperate forests. *Ecosystems*, 7: 1-12.
- Bonkowski, M., B. S. Griffiths & K. Ritz, 2000. Food preferences of earthworms for soil fungi. *Pedobiologia*, 44: 666-676.
- Borcard, D., F. Gillet & P. Legendre, 2011. *Numerical Ecology with R*. Springer, New York.

- Bouyoucos, G. J., 1962. Hydrometer method improved for making particle size analysis of soils. *Agronomy Journal*, 54: 464-465.
- Burns, R. M. & B. H. Honkala (technical coords.), 1990. *Silvics of North America, Volume 2. Hardwoods*. USDA Forest Service, Agricultural Handbook 654. U.S. Dept. of Agriculture, Washington, DC.
- Callahan Jr., M. A., G. Gonzalez, C. M. Hale & L. Heneghan, 2006. Policy and management responses to earthworm invasions in North America. *Biological Invasions*, 8: 1317-1329.
- Cameron, E. K. & E. M. Bayne, 2009. Road age and its importance in earthworm invasion of northern boreal forests. *Journal of Applied Ecology*, 46: 28-36.
- Cameron, E. K., E. M. Bayne & M. J. Clapperton, 2007. Human-facilitated invasion of exotic earthworms into northern boreal forests. *Ecoscience*, 14: 482-490.
- Corio, K., A. Wolf, M. Draney, G. Fewless, 2009. Exotic earthworms of Great Lakes forests: A search for indicator plant species in maple forests. *Forest Ecology and Management*, 258: 1059-1066.
- Decaëns, T., A. F. Rangel, N. Asakawa & R. J. Thomas, 1999. Carbon and nitrogen dynamics in ageing earthworm casts in grasslands of the eastern plains of Colombia. *Biology and Fertility of Soils*, 30: 20-28.
- Domínguez, J., P. J. Bohlen & R. W. Parmelee, 2004. Earthworms increase nitrogen leaching to greater soil depths in row crop agroecosystems. *Ecosystems*, 7: 672-685.
- Edwards, C. A. & P. J. Bohlen, 1996. *Biology and Ecology of Earthworms* (3rd edition). Chapman and Hall, London.
- Eisenhauer, N., S. Partsch, D., Parkinson & S. Scheu, 2007. Invasion of a deciduous forest by earthworms: Changes in soil chemistry, microflora, microarthropods and vegetation. *Soil Biology & Biochemistry*, 39: 1099-1110.
- Eisenhauer, N., O. Butenschoen, S. Radsick, S. Scheu, 2010. Earthworms as seedling predators: Importance of seeds and seedlings for earthworm nutrition. *Soil Biology & Biochemistry*, 42: 1245-1252.
- Environment Canada. Canadian Climate Normals 1971-2000 Station Data. Online [URL]: http://www.climate.weatheroffice.gc.ca/climate_normals/results_e.html?stnID=5530&lang=f&dCode=0&dispBack=&StationName=SHERBROOKE&SearchType=Contains&pro

vince=ALL&provBut=&month1=12&month2=12&submit=Afficher (accessed on 17 July 2013).

Expert Committee on Soil Survey, 1982. The Canada Soil Information System (CanSIS): Manual for Describing Soils in the Field, 1982 Revised. Land Resource Research Institute, Research Branch. Agriculture Canada, Ottawa.

Frostegård, A. & E. Bååth, 1996. The use of phospholipid fatty acid analysis to estimate bacterial and fungal biomass in soil. *Biology and Fertility of Soils*, 22: 59-65.

Frostegård, A., E. Bååth & A. Tunlid, 1993. Shifts in the structure of soil microbial communities in limed forests as revealed by phospholipid fatty acid analysis. *Soil Biology & Biochemistry*, 25: 723-730.

Gates, G. E., 1970. *Miscellanea Megadrilologica VII. Megadrilologica*, 1: 1-14.

Gosselin, J., 2007. Guide de reconnaissance des types écologiques de la région 2c – Coteaux de l'Estrie, Ministère des Ressources naturelles et de la Faune, Forêt Québec, Direction des inventaires forestiers, Division de la classification écologique et productivité des stations. Gouvernement du Québec, Québec.

Groffman, P. M., P. J. Bohlen, M. C. Fisk & T. J. Fahey, 2004. Exotic earthworm invasion and microbial biomass in temperate forest soils. *Ecosystems*, 7: 45-54.

Gundale, M. J., 2002. Influence of exotic earthworms on the soil organic horizon and the rare fern *Botrychium mormo*. *Conservation Biology*, 16: 1555-1561.

Gundale, M. J., W. M. Jolly & T. H. DeLuca, 2005. Susceptibility of a northern hardwood forest to exotic earthworm invasion. *Conservation Biology*, 19: 1075-1083.

Gunn, A., 1992. The use of mustard to estimate earthworm populations. *Pedobiologia*, 36: 65-67.

Haimi, J. & V. Huhta, 1990. Effects of earthworms on decomposition processes in raw humus forest soil: A microcosm study. *Biology and Fertility of Soils*, 10: 178-183.

Hale, C. M., 2008. Evidence for human-mediated dispersal of exotic earthworms: support for exploring strategies to limit further spread. *Molecular Ecology*, 17: 1165-1169.

Hale, C. M., L. E. Frelich & P. B. Reich, 2005a. Exotic European earthworm invasion dynamics in northern hardwood forests of Minnesota, USA. *Ecological Applications*, 15: 848-860.

- Hale, C. M., L. E. Frelich & P. B. Reich, 2006. Changes in hardwood forest understory plant communities in response to European earthworm invasions. *Ecology*, 87: 1637-1649.
- Hale, C. M., L. E. Frelich, P. B. Reich & J. Pastor, 2005b. Effects of European earthworm invasion on soil characteristics in northern hardwood forests of Minnesota, USA. *Ecosystems*, 8: 911-927.
- Hamel, C., K. Hanson, F. Selles, A. F. Cruz, R. Lemke, B. McConkey & R. Zentner, 2006. Seasonal and long-term resource-related variations in soil microbial communities in wheat-based rotations of the Canadian prairie. *Soil Biology & Biochemistry*, 38: 2104-2116.
- Harwood, J. L. & N. J. Russell, 1984. *Lipids in Plants and Microbes*. George Allen & Unwin (Publishers) Ltd, London, UK.
- Holdsworth, A. R., L. E. Frelich & P. B. Reich, 2007a. Effects of earthworm invasion on plant species richness in northern hardwood forests. *Conservation Biology*, 21: 997-1008.
- Holdsworth, A. R., L. E. Frelich & P. B. Reich, 2007b. Regional extent of an ecosystem engineer: earthworm invasion in northern hardwood forests. *Ecological Applications*, 17: 1666-1677.
- James, S. W., 1995. Systematics, biogeography and ecology of Nearctic earthworms from eastern, central, southern and southwestern United States. Pages 29-52 in P. F. Hendrix (ed). *Earthworm Ecology and Biogeography in North America*. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Keller, R. P., A. N. Cox, C. Van Loon, D. M. Lodge, L.-M. Herborg & J. Roghliberger, 2005. From bait shops to the forest floor: Earthworm use and disposal by anglers. *American Midland Naturalist*, 158: 321-328.
- Kent, M. & P. Coker, 1992. *Vegetation Description and Analysis: A Practical Approach*. Belhaven Press. London.
- Knollenberg, W. G., R. W. Merritt & D. L. Lawson, 1985. Consumption of leaf litter by *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta) on a Michigan woodland floodplain. *American Midland Naturalist*, 113: 1-6.
- Lawrence, A. P. & M. P. Bowers, 2002. A test of the 'hot' mustard extraction method of sampling earthworms. *Soil Biology & Biochemistry*, 34: 549-552.

- Lawrence, B., M. C. Fisk, T. J. Fahey & E. R. Suárez, 2003. Influence of nonnative earthworms on mycorrhizal colonization of sugar maple (*Acer saccharum*). *New Phytologist*, 157: 145-153.
- Legendre, P. & E. D. Gallagher, 2001. Ecologically meaningful transformations for ordination of species data. *Oecologia*, 129: 271-280.
- Madan, R., C. Pankhurst, B. Hawke & S. Smith, 2002. Use of fatty acids for identification of AM fungi and estimation of the biomass of AM spores in soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 34: 125-128.
- Marinissen, J.C.Y. & F. van den Bosch, 1992. Colonization of new habitats by earthworms. *Oecologia*, 91: 371-376.
- Magurran, A.E. (1988). *Ecological Diversity and Its Measurement*. Princeton University Press, Princeton, NJ.
- MDDEFP (Ministère du Développement durable, de l'Environnement, de la Faune et des Parcs). Gouvernement du Québec. An act respecting threatened or vulnerable species, chapter E-12.01, Online [URL]:http://www2.publicationsduquebec.gouv.qc.ca/dynamicSearch/telecharge.php?type=2&file=/E_12_01/E12_01_A.htm (Accessed on 6 September 2013).
- Mehlich, A., 1984. Mehlich-3 soil test extractant: a modification of Mehlich-2 extractant. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 15: 1409-1416.
- Milcu, A., J. Schumacher, & S. Scheu, 2006. Earthworms (*Lumbricus terrestris*) affect plant recruitment and microhabitat heterogeneity. *Functional Ecology*, 20: 261-268.
- Mulvaney, R. L. 1996. Nitrogen – Inorganic forms. Pages 1123-1184 in D. L. Sparks et al. (eds.), *Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical Properties*. Soil Science Society of America Book Series 5. SSSA, Madison, WI.
- Murphy, J. & P. Riley, 1962. A modified single solution method for determination of phosphates in natural waters. *Analytica Chimica Acta*, 27: 31-36.
- Oksanen, J., G. F. Blanchet, R. Kindt, P. Legendre, R. B. O'Hara, G. L. Simpson & P. Solymos. *vegan: Community Ecology Package*. R package version 1.17-8. Online [URL]: <http://CRANR-projectorg/package=vegan> (Accessed 14 November 2012).
- Ratledge, C. & S. G. Wilkinson (eds.), 1988. *Microbial Lipids*, Vol. 1. Academic Press, London.

- Reynolds, J. W., 1976. Catalogue et clé d'identification des Lombricidés du Québec. *Naturaliste Canadien*, 108: 21-27.
- Soil Classification Working Group, 1998. The Canadian System of Soil Classification (3rd edition). Agriculture and Agri-Food Canada Publication 1646 (revised). Research Branch. Agriculture and Agri-food Canada, Ottawa.
- Snyder, B. A., M. A. Callahan Jr. & P. F. Hendrix, 2011. Spatial variability of an invasive earthworm (*Amyntas agrestis*) population and potential impacts on soil characteristics and millipedes in the Great Smoky Mountains National Park, USA. *Biological Invasions*, 13: 349-358.
- Tiunov, A. V., C. M. Hale, A. R. Holdsworth & T. S. Vsevolodova-Perel, 2006. Invasion patterns of Lumbricidae into the previously earthworm-free areas of northeastern Europe and the western Great Lakes region of North America. *Biological Invasions*, 8: 1223-1234.
- Welke, S.E., Parkinson, D., 2003. Effect of *Aporrectodea trapezoides* activity on seedling growth of *Pseudotsuga menziesii*, nutrient dynamics and microbial activity in different forest soils. *Forest Ecology and Management*, 173: 169-186.
- Zelles, L., 1999. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterization of microbial communities in soil: a review. *Biology and Fertility of Soils*, 29: 111-129.

CHAPITRE IV

DISCUSSION ET CONCLUSION

De nombreuses recherches sur le sujet semblent indiquer que les vers de terre exotiques ont le potentiel d'influencer négativement le recrutement des espèces végétales forestières. Cependant, à notre connaissance, aucune étude tentant de cibler les mécanismes par lesquels les vers de terre agissent sur la végétation dans le milieu naturel des érablières du sud du Québec n'avait encore été réalisée avant la nôtre. Pourtant, le potentiel de perturbation par les vers de terre invasifs semble important, et les effets négatifs touchent spécifiquement un milieu où l'espèce dominante est à la fois un symbole culturel et une espèce à grande valeur économique. Ainsi, nous avons débuté le projet avec une étude en microcosme, question d'éliminer des effets confondants potentiels et de pouvoir observer les effets des vers de terre sur la germination et la survie des plantules de manière directe. Les résultats de ce volet nous ont par la suite été utiles dans l'interprétation des observations en milieu naturel qui ont suivi lors du second volet de la recherche.

Dans le cadre du volet en microcosme, notre objectif était d'identifier des mécanismes par lesquels les vers de terre affectent le recrutement de certaines espèces d'arbres forestiers indigènes à la province de Québec. Des résultats obtenus par Aira et Pearce (2009), avaient montré que la prédation sur les petites graines de l'agrostis commun favorisait le recrutement d'une espèce à plus grosses graines, le ray-grass anglais. En fonction de ces résultats, nous avons émis l'hypothèse 1.1, stipulant que les *L. terrestris* favoriseraient la germination des espèces à grosses graines. Dans les microcosmes, les taux de germination moyens furent considérablement plus faibles en présence de vers de terre. Cependant, nous avons tout de même dû rejeter l'hypothèse 1.1, puisque bien que le pourcentage de germination de plusieurs espèces fût significativement affecté par les vers de terre, ceux-ci n'eurent pas d'effet significatif sur les espèces ayant les plus petites graines. De plus, le pourcentage de

germination des deux espèces ayant les graines les plus grosses, soit le chêne à gros fruits (*Quercus macrocarpa*) et le caryer cordiforme (*Carya cordiformis*), fût significativement réduit en présence de vers de terre, ce qui allait directement l'encontre de l'hypothèse 1.1. L'hypothèse 1.2, fondée sur les résultats de Grant (1983) qui avait observé une prolongation des temps nécessaires à la germination chez les graines ayant transité dans l'intestin des vers de terre, prédisait un retard dans la germination pour les espèces à petites graines, qui couraient un plus grand risque d'être ingérées. Une seule espèce eut une période de germination allongée en présence de vers de terre, le caryer cordiforme, soit l'espèce produisant les graines de la plus grande taille de toutes celles utilisées dans notre étude, ce qui a mené au rejet de l'hypothèse 1.2. Eisenhauer *et al.* (2010) ont montré que les vers de terre peuvent agir en tant que prédateur sur les graines et les plantules de graminoides et de fabacées, ce qui nous a mené à émettre l'hypothèse 1.3, selon laquelle les vers de terre affecteraient négativement la survie des plantules de petite taille, celles-ci étant probablement plus faciles à enfouir que celles de plus grande taille. Or, les résultats ont montré que 4 espèces furent négativement affectées par l'activité des vers de terre, mais deux d'entre elles avaient des plantules de taille moyenne, soit la tomate (*Solanum lycopersicum* (L.) H. Karst.) et l'érable rouge (*Acer rubrum* L.), ce qui a mené au rejet de cette hypothèse. Finalement, étant donné que les *L. terrestris* n'eurent aucun effet significatif sur la biomasse des plantules, nous avons également dû rejeter hypothèse 1.4, qui prédisait une influence positive de la présence des vers de terre sur la biomasse des plantules. Wurst *et al.* (2003) avaient observé une augmentation de la biomasse des racines et des tiges des plantules du ray-grass anglais et du plantain lancéolé en présence de vers de terre, indiquant une prise de nutriments améliorée en comparaison avec les plantes poussant en absence de vers. Cependant, puisque l'expérience fut de relativement courte durée, il nous a été impossible de distinguer des différences entre les traitements avec et sans vers de terre, probablement dû au fait qu'à la fin de l'expérience, les plantes profitaient toujours des ressources provenant de leur graines plus que des nutriments provenant du sol.

Malgré le fait que nous ayons du rejeter toutes les hypothèses du premier volet, nous avons tout de même remarqué un effet significatif et direct des vers de terre sur le pourcentage de

germination de certaines espèces, ainsi que sur les moments de germination et sur la survie de certaines espèces, ce qui montre que les vers de terre ont un réel potentiel d'affecter le recrutement de certaines espèces forestières, et ce en affectant la germination et la survie des plantules. À l'instar de Eisenhauer *et al.* (2010), nous avons constaté de la prédation sur les graines et plantules, ce qui constitue probablement l'un des mécanismes par lesquels les vers de terre affectent directement le recrutement des espèces forestières. De plus, nous avons été en mesure d'observer la rapidité avec laquelle les vers de terre consommaient la litière, exhibant les graines des espèces de grande taille et les vouant à la dessiccation, ce qui constitue probablement un autre mécanisme par lequel les vers de terre affectent la germination. En ce sens, nous considérons avoir atteint l'objectif du volet et déterminé trois mécanismes potentiels par lesquels les vers de terre affectent le recrutement des espèces forestières. Par contre, contrairement aux résultats obtenus dans le milieu naturel par Hale *et al.* (2006), Holdsworth *et al.* (2007a) et Corio *et al.* (2009), l'érable à sucre ne fut en aucun cas affecté par l'activité des vers de terre, donc nous n'avons pas été en mesure de confirmer que la présence de *L. terrestris* constitue une menace au recrutement de l'espèce. Cependant, puisqu'il s'agit d'une recherche en microcosme, avec des conditions contrôlées dans des installations simplifiées, il est impossible d'appliquer ces résultats directement au milieu naturel. Cependant, cette recherche nous aura permis de montrer que les vers ont le potentiel d'influencer directement le recrutement de certaines espèces arborescentes.

Afin d'avoir une image réaliste de ce qui se produit dans le milieu naturel, nous avons réalisé le second volet de notre expérience dans des érablières de la région de l'Estrie. Puisque nous avons été en mesure d'obtenir des résultats provenant de parcelles contenant différentes EW-FO, dont plusieurs en étaient dépourvues, nous avons pu confirmer que les vers de terre ne sont pas omniprésents dans les forêts du sud du Québec, ce qui constituait notre premier objectif. Notre deuxième constatation fut que les vers de terre ne semblent pas affecter la diversité dans la région de l'Estrie, ce qui nous pousse à réfuter l'hypothèse 2.1, fondée sur les observations de Hale *et al.* (2006). Cependant, les deux composantes du calcul de l'index de diversité étaient significativement influencées: en effet, la richesse spécifique tendait à diminuer en avec l'augmentation de la EW-FO, alors que l'abondance relative des espèces

tendait à augmenter. De plus, nous avons constaté qu'une EW-FO croissante influençait négativement l'abondance de 5 espèces, ce qui nous a permis de valider l'hypothèse 2.2 prédisant une diminution de l'abondance de certaines espèces en fonction d'une augmentation de la EW-FO dans les parcelles. Cette hypothèse était, elle aussi, basée sur les observations de Hale *et al.* (2006), mais également sur celles de Holdsworth *et al.* (2007a) et de Corio *et al.* (2009), qui avaient observé des diminutions de recrutement de certaines espèces, dont l'érable à sucre, dans des forêts envahies. Nous avons donc atteint le second objectif de ce volet qui consistait à vérifier si la EW-FO était reliée à des changements dans l'abondance relative d'espèces végétales de sous-bois et à une réduction globale de la diversité végétale.

Le dernier objectif de ce volet était d'explorer les relations entre la présence des vers de terre, les variables physico-chimiques du sol et les communautés microbiennes et fongiques du sol, qui pourraient expliquer certains changements dans les communautés végétales des sous-bois. Les résultats ont confirmé l'hypothèse 2.3, qui prévoyait que la EW-FO aurait un effet significatif sur certaines des variables physico-chimiques. Cette hypothèse était fondée sur le fait que les vers de terre agissent en tant qu'ingénieurs de l'écosystème par leur habileté à modifier les propriétés physiques et géochimiques de leur habitat (Bohlen *et al.*, 2004c). Afin de visualiser les effets des variables physico-chimiques sur les espèces végétales de sous-bois, nous avons réalisé des analyses de redondance (RDA). Ces RDA nous ont confirmé que la distribution de la variance pour les espèces végétales était significativement influencée par les vers de terre, le pH, le rapport de l'ammonium sur l'azote total, et l'épaisseur de l'horizon organique. L'effet de la EW-FO sur les AMF fut analysé à l'aide de régressions linéaires sur les deux fractions lipidiques des AMF. L'hypothèse 2.4, supportée par Lawrence (2003), prédisait une relation négative entre les AMF et la EW-FO. Cette hypothèse n'a pu être confirmée, puisque qu'une relation positive a été constatée entre les PLFA et la EW-FO, alors qu'aucune relation significative ne fut observée entre les NLFA et la EW-FO. Par contre, il est important de rappeler que l'échantillonnage du sol a pu avoir eu un effet considérable sur les résultats obtenus, puisque celui-ci ne nous a pas permis de différencier les effets des vers de terre des effets de la litière sur les AMF. Or, un échantillonnage différent, dans lequel nous aurions prélevé uniquement du sol minéral en quantité fixe, nous aurait peut-être permis

d'obtenir des résultats différents. Finalement, compte tenu des résultats des régressions linéaires impliquant les données d'estimation de biomasse microbienne et fongique en fonction des EW-FO, il nous a été impossible de confirmer l'hypothèse 2.5, fondée sur les résultats de Binet *et al.* (1998), de Bonkowski *et al.* (2000) et de Groffman *et al.* (2004), qui prédisait que la EW-FO favoriserait la biomasse microbienne mais défavoriserait la biomasse fongique dans le sol. Par contre, l'épaisseur de la matière organique a eu une influence négative significative sur les biomasses bactérienne et fongique, alors que le pH a positivement influencé la biomasse microbienne. Or, même si nous avons dû rejeter l'hypothèse 2.5, il est important de mentionner que les régressions linéaires ont montré que le pH et l'épaisseur de l'horizon organique étaient significativement influencés par la EW-FO. Donc, à la lumière de ces résultats, il est possible d'envisager le fait que les vers de terre aient un effet indirect sur la biomasse microbienne et fongique en agissant sur d'autres variables qui l'influencent significativement.

Nous avons pour objectif principal de fournir des évidences indiquant que les vers de terre influencent négativement le recrutement de certaines espèces forestières. Le premier volet de notre recherche a montré que les vers de terre peuvent avoir un effet négatif direct sur la germination et la survie des plantules, alors que le second volet a indiqué que la EW-FO peut être liée à des changements importants dans la végétation. Bien qu'il nous ait été impossible de vérifier les effets des vers sur les graines et les plantules en milieu naturel, nous avons quand même constaté les relations directes qui existent entre les vers de terre, certaines espèces végétales, et certaines variables physico-chimiques des sols. De plus, les interactions entre les vers de terre et ces mêmes variables ont le potentiel d'influencer la végétation d'avantage, ainsi que de modifier la biomasse bactérienne, qui aura à son tour une influence sur la végétation en accentuant la vitesse de décomposition (Haimi et Huhta, 1990), l'apport de carbone dans le sol (Brown, 1995; Bohlen *et al.*, 2004b; Groffman *et al.*, 2004), et le cycle de l'azote (Brown, 1995; Karsten et Drake, 1997; Decaëns *et al.*, 1999; Bohlen *et al.*, 2004c). En ce sens, bien que le premier volet soit difficilement interprétable dans un cadre naturel, nous pouvons tout de même avancer que la prédation sur les graines et plantules est une possibilité, surtout dans les endroits où des vers de terre anéciques enfouissent la litière à une

vitesse considérable (Eisenhauer *et al.*, 2008). Par ailleurs, l'enfouissement de la litière par les vers de terre fut constaté en microcosmes, mais également sur le terrain. En effet, lors d'une visite sur nos parcelles en mai 2011, nous avons observé une mince couche de litière, probablement issue de la tombée annuelle précédente, alors qu'au mois d'août suivant, le sol était entièrement remis à nu. Comme l'activité des vers de terre est probablement nulle en hiver, ceci confirme que les vers de terre furent en mesure de consommer l'entièreté d'une tombée annuelle en une seule année, empêchant ainsi toute accumulation de litière, ce qui pourrait avoir des conséquences drastique sur les conditions de germination et la survie des plantules de plusieurs espèces, tel que discuté par Bohlen *et al.* (2004c) et Hale *et al.* (2006).

Aucun de nos deux volets ne nous a permis de confirmer les observations de Hale *et al.* (2006), Holdsworth *et al.* (2007a) et Corio *et al.* (2009), selon lesquelles l'abondance des plantules d'érable à sucre était diminuée en présence de vers de terre. Par contre, comme les recherches citées ont eu lieu dans des érablières situées sur le territoire américain, il est possible que différents facteurs biogéoclimatiques entrent en ligne de compte, menant à une différence dans la vulnérabilité de l'érable à sucre face à la présence de vers de terre invasifs. Par exemple, des hivers plus courts pourraient allonger la période d'activité des vers de terre, décuplant les mécanismes observés et amplifiant ainsi leurs effets jusqu'à ce qu'ils touchent des espèces non affectées à notre latitude. Il est important de mentionner à ce sujet qu'en microcosme, les vers de terre ont diminué la survie de l'érable rouge, un proche parent de l'érable à sucre. De plus, l'abondance de l'érable rouge et de l'érable de Pennsylvanie (*Acer pensylvanicum* L.) étaient négativement affectés par la EW-FO en milieu naturel, ce qui indique un effet direct de leur présence sur ces deux espèces d'érables. Il est donc possible de considérer que les effets des vers de terre soient en mesure de s'étendre aux érables à sucre, dans des circonstances qui nous sont pour l'instant inconnues.

Il est certain que l'ensemble de nos résultats permet de remettre en doute le paradigme comme quoi les vers de terre sont des animaux bénéfiques dans tous les types de sols. En ce sens, il serait important de considérer des façons de limiter leur propagation dans les milieux supportant des espèces vulnérables à leur présence. Malheureusement, à l'heure actuelle, le

public est très peu informé sur cet enjeu, alors qu'il demeure probablement à la source du problème en étant potentiellement le principal vecteur de dispersion des vers de terre, notamment par le vermicompostage, la pêche sportive, ainsi que par transport accidentel des cocons (Hendrix et Bohlen, 2002; Bohlen *et al.*, 2004c; Addison, 2009). En ce sens, en plus d'informer le public sur les effets négatifs des vers de terre en milieu naturel, l'implantation de politiques pourrait faire partie de la solution, en interdisant la vente ou l'utilisation de vers de terre en tant qu'appâts de pêche dans les milieux à risque.

De manière générale, ce projet de recherche a permis d'avancer les connaissances sur les effets des vers de terre dans les forêts du sud de la province. Par contre, le principal inconvénient rencontré fut dans la durée des expériences. En effet, les deux volets auraient pu bénéficier d'une plus longue période d'observation, ainsi que d'une plus grande quantité de microcosmes dans le cas du volet en serre, et de parcelles dans le milieu naturel. De plus, lors de l'expérience en microcosme, il aurait été intéressant d'observer un plus grand nombre d'espèces. Puisque l'expérience en milieu naturel nous a montré un effet de la EW-FO sur les frênes et les hêtres (*Fagus grandifolia*), il aurait été intéressant de pouvoir comparer ces résultats avec des données sur la germination et la survie de plantules en microcosmes. De plus, en ce qui concerne les résultats obtenus sur le terrain, nous aurions certainement bénéficié d'une extraction plus précise des vers de terre. En fait, si l'expérience était à répéter, l'extraction des vers de terre serait réalisée sur 1 m³ de sol par parcelle, dans lequel nous extrairions tous les vers de terre afin de déterminer leur nombre exact et l'espèce de chacun. Pour ce faire, une extraction à la moutarde sèche, telle que décrite par Gunn (1992) et Lawrence et Bowers (2002) aurait été idéale et relativement rapide à exécuter. Finalement, puisque nous avons délibérément choisi de prélever les échantillons de sol en ciblant les 30 premiers cm, soit l'habitat dans lequel germent les graines et se forment les premières racines des plantes, nous avons obtenus des échantillons contenant de la matière organique et du sol minéral en proportions variées dépendamment de la EW-FO. Cette façon d'échantillonner nous a par la suite empêché de distinguer avec efficacité l'effet de la matière organique de l'effet des vers de terre sur le recrutement, puisque ceux-ci influençaient directement la concentration de matière organique présente dans nos échantillons. En ce sens, il nous aurait

fallu prendre deux échantillonnages, soit un premier contenant de la matière organique pour avoir le profil complet du sol et un autre contenant uniquement du sol minéral, nous permettant de tirer des conclusions sur les différences observables entre les deux types d'échantillons provenant des mêmes parcelles. Il faut également mentionner que certains effets confondants ont pu influencer les observations. Si les conditions simplifiées en microcosmes ne permettent pas d'extrapoler au milieu naturel, il va sans dire que ce dernier est excessivement plus complexe, que beaucoup de variables entrent en jeu. Plusieurs de ces variables, telles l'émission de composés chimiques secondaires par les racines de certaines plantes, l'herbivorie par le cerfs de virginie (*Odocoileus virginianus*), ainsi que l'exploitation forestière, peuvent avoir un impact important sur le recrutement de certaines espèces. En effet, l'allélopathie pourrait affecter négativement l'abondance de certaines espèces au profit d'autres plus résistantes, la présence du cerf de virginie pourrait ajouter une pression supplémentaire sur certaines espèces par un broutage sélectif, alors que l'exploitation forestière, qui sélectionne généralement des arbres matures d'espèces particulières, pourrait retirer d'importants contributeurs au pool de graines, et donc avoir un impact sur le recrutement de certaines espèces à valeur commerciale.

En plus d'apporter de l'information sur quelques mécanismes par lesquels les vers de terre affectent le recrutement de certaines espèces de sous-bois des érablières à tilleul du sud du Québec, notre recherche aura montré que les vers de terre ne sont pas présents sur l'ensemble du territoire forestier. Il est difficile de prédire exactement à quel niveau l'intégrité des habitats est menacée à long terme, mais le fait que plusieurs espaces forestiers ne contiennent encore aucun vers de terre permet de croire qu'il est toujours temps de limiter les impacts liés à une invasion soutenue. Puisque le transport des vers de terre se produit en grande partie par des activités humaines, il est possible qu'une grande part du succès de la démarche passe par l'information de la population, ainsi qu'en instaurant des politiques interdisant l'utilisation de vers de terre en tant qu'appâts de pêche. Par contre, quelques questions demeurent, ce qui pourrait justifier de nouvelles recherches sur le sujet. Par exemple, beaucoup d'espèces végétales analysées lors du premier volet de notre expérience ont une distribution qui s'étend dans la forêt boréale. De plus, plusieurs de ces espèces ont montré une vulnérabilité face à la

présence des vers de terre au niveau de leur germination et de leur survie en tant que plantule, ce qui provoque des inquiétudes quand à la propagation des vers de terre en forêt boréale, où plusieurs espèces végétales ont une grande valeur commerciale. La présence de vers de terre invasifs a déjà été documentée en Alberta (Cameron *et al.*, 2007; Cameron et Bayne, 2009) ainsi qu'au nord du fleuve St-Laurent dans la province de Québec (Moore *et al.*, 2009), ce qui porte à croire que des changements importants pourraient s'y produire également, dépendamment de la capacité des vers à envahir un sol plus acide (Addison, 2009). De plus, des recherches mettant à profit la multitude de territoires couverts par des érablières privées pourraient être réalisées, afin de vérifier si les vers de terre constituent bel et bien une menace pour l'érable à sucre en tant qu'espèce à grande valeur économique et culturelle pour la province. Finalement, des études comportementales pourraient être réalisées sur des vers de terre des différentes espèces, en les soumettant à différentes quantités de litière, à des litières de différentes palatabilités et à différentes températures. Une telle expérience permettrait peut-être de déterminer à quel moment de la saison, dans quels types de milieux et avec quelles espèces de vers de terre les plus grands changements sont à prévoir, ce qui pourrait faire la lumière sur les problèmes de recrutement de différentes espèces en fonction de leur période de germination. Par la suite, des études en milieu naturel pourraient permettre de quantifier les impacts de ces différentes espèces de vers de terre sur le milieu forestier.

BIBLIOGRAPHIE

Addison, J.A. (2009). Distribution and impacts of invasive earthworms in Canadian forests ecosystems. *Biol. Invasions* 11, 59-79.

Aira, M., Pearce, T.G. (2009). The earthworm *Lumbricus terrestris* favours the establishment of *Lolium perenne* over *Agrostis capillaris* seedlings through seed consumption and burial. *Appl. Soil Ecol.* 41, 360-363.

Binet, F., Hallaire, V., Curmi, P. (1997). Agricultural practices and the spatial distribution of earthworms in maize fields. Relationships between earthworm abundance, maize plants and soil compaction. *Soil Biol. Biochem.* 29, 577-583.

Bohlen, P.J., Groffman, P.M., Fahey, T.J., Fisk, M.C., Suárez, E., Pelletier, D.M., Fahey, R.T. (2004a). Ecosystem consequences of exotic earthworm invasion of north temperate forests. *Ecosystems* 7, 1-12.

Bohlen, P.J., Pelletier, D.M., Groffman, P.M., Fahey, T.J., Fisk, M.C. (2004b). Influence of earthworm invasion on redistribution and retention of soil carbon and nitrogen in northern temperate forests. *Ecosystems* 7, 13-27.

Bohlen, P.J., Scheu, S., Hale, C.M., McLean, M.A., Migge, S., Groffman, P.M., Parkinson, D. (2004c). Non-native invasive earthworms as agent of change in northern temperate forests. *Front. Ecol. Environ.* 2, 427-435.

Bonkowski, M., Griffiths, B.S., Ritz, K. (2000). Food preferences of earthworms for soil fungi. *Pedobiologia* 44, 666-676.

Brown, G.G. (1995). How do earthworms affect microfloral and faunal community diversity? *Plant Soil* 170, 209-231.

Cameron, E.K., Bayne, E.M. (2009). Road age and its importance in earthworm invasion of northern boreal forests. *J. Appl. Ecol.* 46, 28-36.

Cameron, E.K., Bayne, E.M., Clapperton, M.J. (2007). Human-facilitated invasion of exotic earthworms into northern boreal forests. *Écoscience* 14, 482-490.

Capowiez, Y., Samartino, S., Cadoux, S., Bouchant, P., Richard, G., Boizard, H. (2012). Role of earthworms in regenerating soil structure after compaction in reduced tillage systems. *Soil. Biol. Biochem.* 55, 93-103.

Corio, K., Wolf, A., Draney, M., Fewless, G. (2009). Exotic earthworms of great lakes forests: A search for indicator plant species in maple forests. *For. Ecol. Manag.* 258, 1059-1066.

Cortez, J., Bouché, M.B. (1998). Field decomposition of leaf litters: Earthworm-microorganism interactions – the ploughing effect. *Soil. Biol. Biochem.* 30, 795-804.

Darwin, C.R. (1881) *The formation of vegetable mould through the action of worms, with observation on their habits.* (London: John Murray)

Decaëns T., Mariani, L., Betancourt, N. Jiménez, J.J. (2003). Seed dispersion by surface casting activities of earthworms in Colombian grasslands. *Acta Oecologia* 24, 175-185.

Decaëns, T., Rangel, A.F., Asakawa, N., Thomas, R.J. (1999). Carbon and nitrogen dynamics in ageing earthworm casts in grasslands of the eastern plains of Colombia. *Biol. Fert. Soils* 30, 20-28.

Devliegher, W., Verstraete, W. (1997). The effect of *Lumbricus terrestris* on soil in relation to plant growth: effects of nutrient-enrichment processes (NEP) and gut-associated processes (GAP). *Soil. Biol. Biochem.* 29, 341-346.

Eisenhauer, N., Butenschoen, O., Radsick, S., Scheu, S. (2010). Earthworms as seedling predators: Importance of seeds and seedlings for earthworm nutrition, *Soil Biol. Biochem.* 42, 1245-1252.

Eisenhauer, N., Marhan, S., Scheu, S. (2008). Assessment of anecic behavior in selected earthworm species: Effects on wheat seed burial, seedling establishment, wheat growth and litter incorporation. *Appl. Soil Ecol.* 38, 79-82.

Fisk, M.C., Fahey T.J., Groffman P.M., Bohlen P.J. (2004). Earthworm invasion, fine root distribution and soil respiration in hardwood forests. *Ecosystems* 7, 55-62.

Gange, A.C. (1993). Translocation of mycorrhizal fungi by earthworms during early succession. *Soil Biol. Biochem.* 25, 1021-1026.

Gates, G.E. (1970). *Miscellanea Megadrilogica VII. Megadrilogica 1*, 1-14.

Gosselin, J. (2007). *Guide de reconnaissance des types écologiques de la région 2c – Coteaux de l'Estrie*, ministère des Ressources naturelles et de la Faune, Forêt Québec, Direction des inventaires forestiers, Division de la classification écologique et productivité des stations. (Québec: Gouvernement du Québec).

- Grant, J.D. (1983). The activities of earthworms and the fates of seeds. *Earthworm Ecology: From Darwin to Vermiculture*, Satchell (London: Chapman & Hall), pp 107-122.
- Groffman, P.M., Bohlen, P.J., Fisk, M.C., Fahey, T.J. (2004). Exotic earthworm invasion and microbial biomass in temperate forest soils. *Ecosystems* 7, 45-54.
- Gundale, M.J. (2002). Influence of exotic earthworms on the soil organic horizon and the rare fern *Botrychium mormo*. *Conserv. Biol.* 16, 1555-1561.
- Gundale, M.J., Jolly, W.M., Deluca, T.H. (2005). Susceptibility of a northern hardwood forest to exotic earthworm invasion. *Conserv. Biol.* 19, 1075-1083.
- Gunn, A. (1992). The use of mustard to estimate earthworm populations. *Pedobiologia* 36, 65-67.
- Haimi, J., Huhta, V. (1990). Effects of earthworms on decomposition processes in raw humus forest soil: A microcosm study. *Biol. Fert. Soils* 10, 178-183.
- Hale, C.M. (2004). Ecological consequences of exotic invaders: interactions involving European earthworms and native plant communities in hardwood forests. Ph. D. thesis, University of Minnesota, Minnesota.
- Hale, C.M., Frelich, L.E., Reich, P.B. (2005a). Exotic European earthworm invasion dynamics in northern hardwood forests of Minnesota, USA. *Ecol. Appl.* 15, 848-860.
- Hale, C.M., Frelich, L.E., Reich, P.B., Pastor, J. (2005b). Effects of European earthworm invasion on soil characteristics in northern hardwood forests of Minnesota, U.S.A. *Ecosystems* 8, 911-927.
- Hale, C.M., Frelich, L.E., Reich, P.B. (2006). Changes in hardwood forest understory plant communities in response to European earthworm invasions. *Ecology* 87, 1637-1649.
- Hendrix P.F., Bohlen P.J. (2002). Exotic earthworm invasions of North America: ecological and policy implications. *Bioscience* 52, 801-811.
- Holdsworth, A.R., Frelich, L.E., Reich, P.B. (2007a). Effects of earthworm invasion on plant species richness in northern hardwood forests. *Conserv. Biol.* 21, 997-1008.
- Holdsworth, A.R., Frelich, L.E., Reich, P.B. (2007b). Regional extent of an ecosystem engineer: earthworm invasion in northern hardwood forests. *Ecol. Appl.* 17, 1666-1677.

- Karsten, G.R., Drake, H.L. (1997). Denitrifying bacteria in the earthworm gastrointestinal tract and in vivo emission of nitrous oxide (N₂O) by earthworms. *Appl. Environ. Microb.* *63*, 1878-1882.
- Keller, R.P., Cox, A.N., Van Loon, C., Lodge, D.M., Herborg, L.-M., Roghliberger, J. (2005). From bait shops to the forest floor: Earthworm use and disposal by anglers. *Am. Midl. Nat.* *158*, 321-328.
- Knollenberg, W.G., Merritt, R.W., Lawson, D.L. (1985). Consumption of leaf litter by *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta) on a Michigan woodland floodplain. *Am. Midl. Nat.* *113*, 1-6.
- Lawrence, A.P., Bowers, M.P. (2002). A test of the 'hot' mustard extraction method of sampling earthworms. *Soil Biol. Biochem.* *34*, 549-552.
- Lawrence, B., Fisk, M.C., Fahey, T.J., Suárez, E.R. (2003). Influence of nonnative earthworms on mycorrhizal colonization of sugar maple (*Acer saccharum*). *New Phytol.* *157*, 145-153.
- Maerz, J.C., Nuzzo, V.A., Blossey, B. (2009). Declines in woodland salamander abundance associated with non-native earthworm and plant invasions. *Conserv. Biol.* *23*, 975-981.
- Marinissen, J.C.Y., van den Bosch, F. (1992). Colonization of new habitats by earthworms. *Oecologia* *91*, 371-376.
- Moore, J.-D., Ouimet, R., Reynolds, J.W. (2009). Premières mentions de vers de terre dans trois écosystèmes forestiers du Bouclier Canadien. *Nat. Can.* *133*, 31-37.
- Pearce, T.G., Roggero, N., Tipping, R. (1994). Earthworms and seeds. *J. Biol. Educ.* *28*, 195-202.
- Suárez, E.R., Fahey, T.J., Groffman, P.M., Yavitt, J.B., Bohlen, P.J. (2006). Spatial and temporal dynamics of exotic earthworm communities along invasion fronts in a temperate hardwood forest in South-Central New York (USA). *Biol. Invasions* *8*, 553-564.
- Talashilkar, S.C., Dosani, A.A.K. (2005). Earthworms in agriculture. (Johdpur, India; Agrobios).
- Tiunov, A.V., Hale, C.M., Holdsworth, A.R., Vsevolodova-Perel, T.S. (2006). Invasion patterns of *Lumbricidae* into the previously earthworm-free areas of northeastern Europe and the western Great Lakes region of North America. *Biol. Invasions* *8*, 1223-1234.

Wurst, S., Langel, R., Reineking, A., Bonkowski, M., Scheu, S. (2003). Effects of earthworms and organic litter distribution on plant performance and aphid reproduction. *Oecologia* 137, 90-96

