

## *INVAGRAINES* - Invasions de peuplements forestiers par des insectes séminiphages exotiques : mécanismes, conséquences écologiques et moyens de surveillance

**Coordinateur** : Alain ROQUES

Unité de Zoologie Forestière, INRA, Orléans

### **Participants**

Marie-Anne AUGER-ROZENBERG & Solen BOIVIN, Unité de Zoologie Forestière, INRA, Orléans

Marie- Louise CARIOU & Jean-François SILVAIN, Laboratoire *Populations, Génétique et Evolution*, CNRS, Gif / Yvette

Bruno FADY, Unité de Recherches Forestières Méditerranéennes, INRA, Avignon

**Mots clés** : invasion – insecte – forêt – graines - régénération naturelle

### Summary

The project aimed at contributing to understand the ecological and genetic mechanisms underlying the possibilities of establishment of exotic insects in the genus *Megastigmus* (Hymenoptera: Torymidae), specialized in the exploitation of forest seeds, and at defining suitable methods of monitoring and management of the invasive insect populations. For that, we intended to compare two distinct models host seed/ *Megastigmus*, crossing different first date of invasion and taxonomic structure of the forests: (i) true firs (*Abies*)/*Megastigmus* where the resource, indigenous, is exploited by a native species, *M. suspectus*, in competition with at least 5 invasive species of North American origin, and (ii) true cedars (*Cedrus*)/*Megastigmus* where the resource, itself exotic, is exploited by 2 invasive species without native candidates.

In a large seed sampling, involving 169 *Abies* stands in France and 55 in other European countries (Germany, Belgium, Bulgaria, Denmark, Spain, Greece, Italy, Norway, Poland, Romania, Switzerland, Tchèque) and from the Middle East (Lebanon, Turkey), 90% of the seed lots presented chalcid damage, with a rate of attack higher than 50% in ca. 1/3 of them. On the whole, 5 invasive species coming from North America were observed (*M. rafni*, *M. pinus*, *M. milleri*, *M. specularis*, and *M. lasiocarpae*) beside the native species *M. suspectus*. At present, exotic chalcids largely predominate in Western Europe, displacing the native seed chalcids. *M. rafni* appears to be the most important species especially in natural fir stands with a much larger range than in the 1990s. In a similar way on Cedar, the exotic species *M. schimitscheki*, largely expanded since its introduction in the early 1990s and it supplants from now the other species introduced since a longer date (years 1950), *M. pinsapinis*, who was the only species observed in the years 1980.

Several biological features likely to be implied in the apparent competitive superiority of both *M. rafni* and *M. schimitscheki* were examined in comparison to these of native species and dominated exotic species: length of female ovipositor, capability of developing in unpollinated seeds, parthenogenesis, phenology of adult emergence, prolonged diapause. These elements appear relatively contradictory between them to explain the statute dominating of *M. rafni*, at least. For instance the species has the longest ovipositor, allowing it to oviposit in all cone species independently of cone size, and is capable of developing until adult in unpollinated seeds. However, it is the latest species to emerge and it is not a thelytokous species conversely to the native *M. suspectus*. Bag tests were carried out using simultaneously or not the different species to look for resource sharing but the results will be available only during summer 2006 following adult emergence. On cedar, the same bagging experiments showed a division of the niche between *M. schimitscheki* and *M. pinsapinis*. Both

prefer the apical part of the cone in non-competition situation but when the two species are placed in the same bag, their attacks added on the apical part rather than distribute on the cone.

When insects from North America were compared with these of Europe using mtDNA sequencing (cyt b), it appeared with no doubt that the individuals present in Europe belong well to North-American species, in particular *M. milleri* who was regarded as absent from Europe until the end of 1990s. This study in addition showed that the species *M. pinus*, presents in many European sites, has two haplotypes very different, suggesting two cryptic species. A phylogeographic study of *M. rafni* using both mitochondrial and nuclear markers (EF-1 $\alpha$  elongation gene, ITS2) showed the existence of two distinct clades separated by strong genetic distances (3.5%), suggesting different routes of invasion. A set of 6 microsatellite markers was used to analyse the genetic structure of the populations of *M. rafni* in the areas of origin and invasion. The results suggested an absence of structure according to the fir host species, but a clear differentiation of the Danish populations, which have a very low variability, suggesting a probable bottleneck. On *Cedrus*, 5 loci microsatellites were used to study the genetic structuring of the populations of *Megastigmus schimitscheki*. Populations of the native zone (Cyprus, Turkey) were highly polymorphic and spatially structured, and largely differentiated from those of the introduction zone of southeastern France, fewly polymorphic. We suggested a strong bottleneck connected to a recent and limited introduction, even limited to only one origin. Only two of these populations show a stronger differentiation however, and are both located on the current face of expansion in direction of the Alps of the South. The invasive history of the exotic species on Cedar and fir trees thus appears largely different.

The additional impact of the invasive exotic species on the potential of natural regeneration of the European fir plantations is quantitatively consequent. Whereas in the years 1980, seed damage by *M. suspectus* very seldom exceeded 15%, percentages of attack higher than 50% are not rare any more (17.6% of the cases) due to the addition of the exotic species. On the other hand, the qualitative impact on the genetic pool of the fir plantations seemed much more limited. In particular, self-fertilized fir trees were equally infested as cross-fertilized trees.

On a more general level, the taxonomic closeness of the native trees with respect to original host of the exotic insect seemed to constitute a relevant criterion to estimate the probability of establishment of exotic insects associated to forest trees. We also developed simple and cheap methods for monitoring insect infestation in seed lots at importation, based on differential flotation in solvents related to seed density. A booklet will be published gathering these data. We expect it could help in defining regulations at importation of forest seeds whereas such regulations do not exist in the European Union yet, and thus favour invasion of exotic seed insects.

## Résultats

Le projet se proposait de contribuer à la compréhension des mécanismes écologiques et génétiques sous-tendant les possibilités d'installation durable des insectes exotiques du genre *Megastigmus*, spécialisés dans l'exploitation des graines forestières, et de définir des méthodes appropriées de surveillance et de gestion de ces populations d'insectes. Pour cela, nous entendions comparer deux modèles distincts graine- *Megastigmus*, croisant ancienneté d'invasion et structure taxonomique des forêts, dans le but de pouvoir décortiquer les différentes étapes du processus d'invasion, d'installation et de colonisation de nouveaux hôtes : (i) Sapin (*Abies*)/ *Megastigmus* où la ressource, autochtone, est exploitée par une espèce native, *M. suspectus*, en compétition avec au moins 5 espèces invasives d'origine nord-américaine, et (ii) Cèdre (*Cedrus*)/ *Megastigmus* où la ressource, elle-même exotique

introduite, est exploitée par 2 espèces invasives sans compétiteurs natifs. Le premier modèle devait faire l'objet des expérimentations de ce projet alors que le second était traité par une thèse de Doctorat menée en parallèle (Boivin, 2006). Les objectifs généraux du projet étaient donc les suivants :

- Préciser l'aire de distribution actuelle en France et en Europe des différentes espèces invasives sur Sapins et Cèdre comparée à l'aire des insectes autochtones
- Définir le potentiel compétitif des espèces invasives pour l'utilisation de la ressource- graine en regard de celui des seminiphages autochtones ;
- Caractériser à l'aide de marqueurs moléculaires la différenciation des populations introduites en France et en Europe par rapport à des populations des zones d'origine, et tenter de retracer l'histoire de ces introductions, ainsi que les possibilités d'hybridation entre espèces natives et introduites de *Megastigmus*;
- Analyser les conséquences de l'invasion sur les potentialités, et l'orientation de la régénération naturelle dans les peuplements forestiers envahis;
- Définir des outils méthodologiques généraux pour la gestion des seminiphages forestiers invasifs et mettre au point des méthodes de surveillance à l'importation des graines forestières.

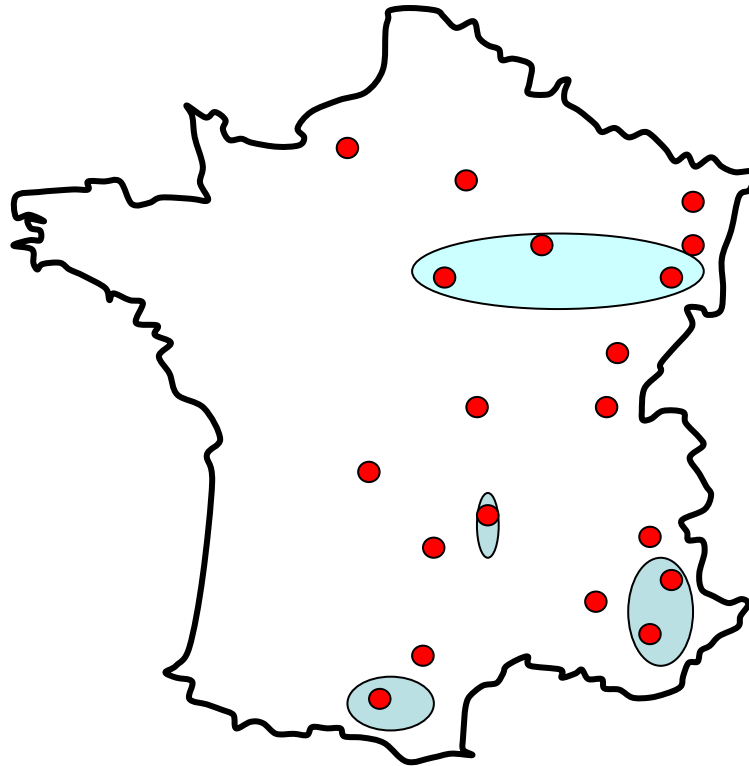
## 1. Résultats scientifiques

### 1.1. Large dominance des chalcidiens exotiques introduits en Europe de l'Ouest

Des récoltes standardisées de graines ont été réalisées entre 2002 et 2005 de sorte à couvrir l'aire naturelle des sapins natifs en France et en Europe, mais aussi leur aire d'introduction incluant celle de certaines autres espèces exotiques plantées en Europe. Un échantillon de 200 à 500 graines prélevées au hasard par site, a été ainsi obtenu pour 169 sites répartis sur l'ensemble de la France et pour 55 sites européens (Allemagne, Belgique, Bulgarie, Danemark, Espagne, Grèce, Italie, Norvège, Pologne, Roumanie, Suisse, Tchéquie) et du Proche-Orient (Liban, Turquie). Tous les échantillons de graines ont été radiographiés et on a compté le nombre de graines saines, vides et infestées par les insectes afin d'estimer le pourcentage global d'attaque par les chalcidiens, puis les graines infestées ont été placées en tubes d'élevage individuel jusqu'à l'émergence des adultes, identifiés alors au niveau spécifique. Au total, 7363 graines infestées ont ainsi été élevées individuellement. Près de 90% des peuplements échantillonnés (195 sur 224) présentaient une infestation par des larves de chalcidiens, avec un taux d'attaque supérieur à 50% des graines pleines dans environ un tiers d'entre eux sans que l'on puisse identifier de différences significatives entre régions géographiques.

D'importants phénomènes de diapause prolongée ont limité les émergences en 2003 et 2004, En relation avec l'évolution de l'abondance annuelle des graines- hôtes, les insectes peuvent en effet prolonger leur développement larvaire sur plusieurs années sans émerger à l'état d'adultes. En revanche, des sorties massives d'adultes ont eu lieu durant les années 2005 et 2006, et ainsi permis d'estimer la proportion relative de chaque espèce sur les différents sites. Au total, 5 espèces invasives en provenance d'Amérique du Nord ont été observées (*M. rafni*, *M. pinus*, *M. milleri*, *M. specularis*, et *M. lasiocarpae*) à côté de l'espèce native *M. suspectus*. Les trois premières espèces exotiques ont désormais envahi l'ensemble de l'Europe de l'Ouest (France, Allemagne, Belgique, Danemark) mais semblent encore absentes de l'Europe centrale, septentrionale (au-dessus du Danemark) et méridionale, où seule l'espèce native a été observée. Sur la plupart des sites d'Europe de l'Ouest, et en particulier dans l'aire naturelle du sapin pectiné, *M. rafni* apparaît largement dominer la faune des chalcidiens des graines de sapins. *M. pinus* et *M. milleri* sont moins abondants à l'exception de quelques peuplements du Morvan, du Jura et du nord- Aveyron. Les deux autres espèces exotiques sont

encore anecdotiques (Danemark). L'espèce native n'a été majoritairement observée que dans une seule plantation de sapin du nord-est de la France, alors qu'elle était partout largement dominante dans les années 1980 (Roques, 1983). Alors que *M. rafni* n'a été détecté en France qu'au début des années 1990, son aire s'est donc très largement étendue durant la dernière décennie (Figure 1), et cette espèce exotique semble avoir déplacé la faune autochtone sur sapin.



**Figure 1.** Carte de la présence de *M. rafni* en France comparée à la distribution connue en 1992 (grisé).

De manière similaire sur Cèdre, l'espèce exotique *M. schimitscheki*, introduite au Mont Ventoux au début des années 1990 en provenance de Turquie, a vu son aire d'expansion s'étendre rapidement sur la quasi-totalité du Sud-Est de la France (Boivin, 2006). Elle supprime désormais largement l'autre espèce introduite depuis plus longue date (années 1950), *M. pinsapinis*, qui était la seule espèce observée dans les années 1980 (Fabre *et al.* 2004).

### 1.2. Supériorité compétitive de certaines espèces exotiques

L'étude comparative du potentiel compétitif des espèces natives et exotiques invasives a consisté à tester la pertinence de plusieurs traits biologiques susceptibles d'être impliqués. On a ainsi examiné la variabilité de la longueur de l'ovipositeur femelle en relation avec les dimensions du cône et l'accessibilité des graines chez différentes espèces de sapins. Il a été mis en évidence que *M. rafni* présente l'ovipositeur le plus long en moyenne (5.2 mm contre 5.0 mm chez *M. suspectus*) mais aussi que de très fortes variations affectent la longueur de cet ovipositeur chez cette même espèce (2,61 - 6,29 mm). Ce polymorphisme est principalement dû au polymorphisme de taille des graines où a évolué la larve, et peut constituer un paramètre important dans l'adaptabilité de ce chalcidien invasif. Les premiers résultats concernant les relations de la taille de l'ovipositeur avec l'épaisseur du cône montrent que les femelles issues d'espèces de sapins à graines volumineuses seraient susceptibles de coloniser un grand nombre d'espèces de sapins alors que les femelles issues de petites graines de

certaines sapins américains (*Abies grandis*) pourraient être limitées à la colonisation d'espèces à petits cônes peu épais.

A partir d'expériences sous bonnettes prévenant la pollinisation, nous avons démontré que *M. rafni* présente un avantage important, celui de pouvoir se développer complètement dans des graines non pollinisées et non fécondées. Dans une étude menée en parallèle, mais de façon reliée, chez une espèce voisine également invasive en Europe (*Megastigmus spermotrophus* du sapin de Douglas), nous avons démontré que la larve modifie le devenir de l'endosperme supposé très vite avorter en l'absence de pollinisation, en induisant une néosynthèse de composés protéiques et d'amidon de manière identique à l'activité d'un embryon végétal (Rouault *et al.* 2004 ; Van Aderkas *et al.* 2005a, 2005b). Il reste cependant à voir si ce processus est complètement identique chez *M. rafni* et si les autres espèces en compétition, notamment *M. suspectus*, l'exhibent ou non. Un des autres avantages supposés essentiels pour une espèce invasive consiste dans la capacité à se développer sans nécessiter la rencontre des sexes. Si les *Megastigmus* sont capables de parthénogénèse arrhénotoque, certains dont l'espèce native *M. suspectus*, ainsi que *M. pinsapinis* sur Cèdre, sont thélytoques et capables de produire en continu des lignées femelles. A ce titre, elles devraient donc être avantagées. Or dans les deux cas, les espèces dominantes, *M. rafni* (mais aussi *M. pinus* et *M. milleri* sur sapin) et *M. schimitscheki*, présentent un sex-ratio à peu près équilibré.



**Figure 2.** Ponte simultanée de *M. schimitscheki* et *M. pinsapinis* sur cône de cèdre.

La phénologie comparative d'émergence des adultes des différentes espèces de *Megastigmus* en relation avec l'apparition des stades sensibles des cônes a été étudiée par le placement *in situ* de graines infestées, et l'enregistrement des paramètres climatiques correspondants via des micro-capteurs climatiques. Une séquence d'émergence standard a été mise en évidence, avec de manière successive dans le temps sur environ 1 mois : *M. pinus* - *M. milleri* - *M. suspectus* - *M. rafni*. L'espèce dominante, *M. rafni*, est donc toujours l'espèce la plus tardive, ce qui pourrait la défavoriser si l'abondance des hôtes est très limitée. Sur cèdre à l'inverse, l'espèce dominante *M. schimitscheki*, est toujours la plus précoce (Fabre *et al.* 2004 ; Boivin 2006). On doit cependant prendre en compte la possibilité de diapause prolongée différentielle entre espèces, certaines espèces émergeant massivement quand d'autres restent en diapause prolongée et vice-versa. Les données que nous avons obtenues sur sapin le suggèrent, avec une forte émergence de *M. rafni* en 2005 et de *M. suspectus* en 2006. Il en est de même sur cèdre (Fabre *et al.* 2004). Mais la durée limitée du projet comparé à celle possible pour la diapause prolongée (4-5 ans) ne permet pas encore de conclure.

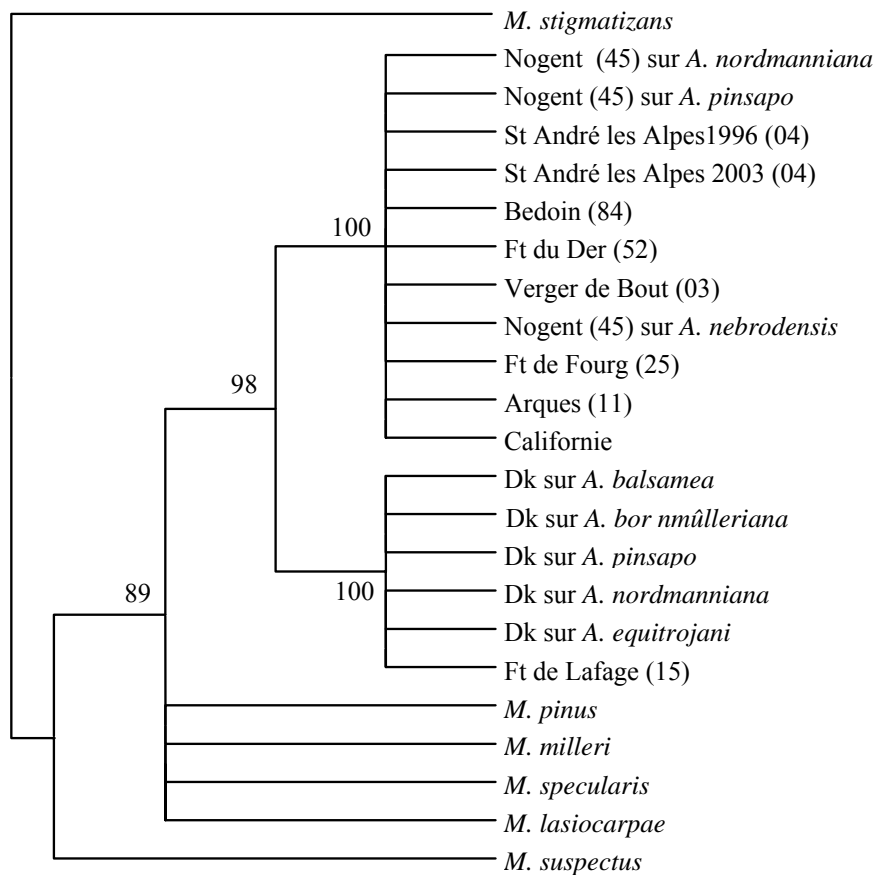
Ces éléments paraissent donc relativement contradictoires entre eux pour expliquer le statut dominant de *M. rafni*. Afin d'avoir une appréciation globale des processus de compétition, et aussi d'éventuels partages de la ressource- cône en fonction de la taille de l'ovipositeur (aptitude à pondre dans les zones les plus larges du cône), des expérimentations de ponte forcée sous bonnettes ont donc visé à apprécier la distribution spécifique des larves dans le cône en fonction de l'importance de la compétition. En utilisant toutes les espèces natives et invasives (*M. suspectus*, *M. lasiocarpae*, *M. milleri*, *M. pinus*, *M. rafni*, *M. specularis*), des situations impliquant une seule à 3 espèces en compétition ont été testées, avec ou sans mâles d'une autre espèce pour également les possibilités d'hybridation. En raison de faibles fructifications, ces expérimentations n'ont pu se dérouler en vraie grandeur qu'en 2005, et on ne disposera donc des résultats qu'à l'été 2006 après émergence des adultes.

Sur cèdre, les mêmes expériences d'ensachement démontrent un partage de la niche entre *M. schimitscheki* et *M. pinsapinis*. Toutes deux préfèrent la partie apicale du cône en situation de non- compétition. Mais lorsque les deux espèces sont placées dans la même bonnette, leurs attaques s'additionnent sur la partie apicale plutôt que de se distribuer sur les autres parties du cône (Boivin, 2006).

### ***1.3. Une faible différenciation des populations invasives mais présence vraisemblable d'espèces cryptiques***

L'aire naturelle nord-américaine des sapins a été partiellement échantillonnée en 2002, 2004 et 2006 (Colombie Britannique, Québec, Washington, Orégon, Californie, Nouveau-Mexique, Caroline du Nord) avec des prélèvements sur différentes espèces de sapins- hôtes (*Abies grandis*, *A. procera*, *A. lasiocarpa*, *A. concolor*, *A. fraseri*, *A. balsamea*) des 5 espèces de chalcidiens supposés introduits en Europe. Le séquençage d'une partie du gène du cytochrome *b* de l'ADN mitochondrial (ca. 715pb) chez les spécimens américains obtenus comparé à celui de leurs homologues européens a montré avec certitude que les individus présents en Europe appartiennent bien à des espèces nord-américaines, notamment *M. milleri* qui était considérée comme absente d'Europe jusqu'à la fin des années 90, et qui a clairement été identifiée dans les peuplements de sapins gérés par l'ONF dans le Cantal et le Doubs. (Auger- Rozenberg *et al.* 2006). Cette étude a par ailleurs montré que l'espèce *M. pinus*, présente dans de nombreux sites européens, possède deux haplotypes très différents, suggérant deux espèces cryptiques.

Au niveau populationnel, l'analyse génétique comparative des populations introduites et des populations des zones d'origine a porté essentiellement sur l'espèce exotique dominante en Europe de l'Ouest, *M. rafni*. Une étude phylogéographique des populations a été effectuée à l'aide de marqueurs mitochondriaux (*cyt b*) et nucléaire (régions introniques du gène codant pour le facteur d'élongation EF-1 $\alpha$  et la région intergénique ITS2 localisée entre les gènes ribosomiques 5,8S et 28S, toutes deux supposées évoluer rapidement). Les résultats obtenus à partir de l'ADN mitochondrial montrent l'existence de deux clades distincts séparés par de fortes distances génétiques (3.5%), le premier regroupant tous les insectes issus du Danemark et quelques populations françaises (Cantal, Normandie, Aisne) et le second regroupant la population native californienne et les autres populations françaises. Il est possible que cette différenciation soit due à une introduction provenant de sites très distincts de la zone d'origine qui s'étend sur plusieurs milliers de kilomètres sur la côte Ouest de l'Amérique du Nord, de la Colombie Britannique à la Californie. Au niveau nucléaire, la recherche d'un gène candidat à l'étude phylogéographique des populations a permis la mise en évidence d'une structure originale du gène EF-1 $\alpha$  chez *M. rafni*, où l'amplification de deux fragments de taille différente chez un certain nombre d'individus suggère la présence de deux gènes alors qu'il est connu en copie unique chez la plupart des Arthropodes.



**Figure 3.** Arbre des individus obtenus par Neighbor-Joining sur séquence de mtADN (cyt. *b*) pour différents spécimens de *M. rafni* et d'autres espèces invasives de *Megastigmus* (Dk = individus prélevés au Danemark. Les valeurs de bootstrap ont été calculées sur 1000 répliques).

L'analyse de la structuration génétique des populations de *M. rafni* dans les zones d'origine et d'invasion a été menée à partir de l'identification de 6 loci microsatellites, qui se sont révélés suffisamment variables. Les résultats suggèrent une absence de structuration des populations d'insectes en fonction des espèces de sapin-hôtes, mais une nette différenciation des populations danoises, qui présentent une très faible variabilité, suggérant l'existence probable de phénomènes de bottleneck dans cette zone d'introduction. A l'inverse, la seule population de la zone d'origine (Californie) disponible en nombre montre une très forte variabilité. Une population récoltée dans le Jura est aussi polymorphe que celle de Californie et les deux populations ne présentent pas de différenciation génétique significative. L'absence de différenciation entre ces deux populations laisse penser que le Jura pourrait correspondre soit à un point d'introduction récent en provenance éventuelle de Californie, soit à une population présentant de nombreux flux de gènes avec d'autres populations, issues des mêmes zones. Globalement, on observe un excès d'hétérozygotes dans la majorité des populations étudiées. Au final, la faible variabilité moléculaire des séquences analysées chez *M. rafni* pourrait signifier qu'une durée d'un siècle environ n'est pas suffisante pour permettre la différenciation significative des populations introduites avec cependant une interrogation pour la population du Danemark. Elle pourrait également signifier que toutes les populations présentes en France sont issues d'une seule introduction alors que celle du Danemark pourrait résulter d'un événement de colonisation distinct. L'inclusion dans l'analyse de populations complémentaires issues d'autres peuplements de la zone d'origine, qui sont en train d'émerger en 2006, devrait une meilleure compréhension de la structuration des populations de l'espèce invasive.

Sur Cèdre, où 5 loci microsattelites ont été utilisés pour étudier la structuration génétique des populations de *Megastigmus schimitscheki*, on a pu mettre en évidence une large différenciation entre populations de la zone native (Chypre, Turquie), très polymorphes et spatialement structurées, et celles de la zone d'introduction du sud-est de la France, très peu polymorphes. On a établi un fort effet dépressif relié à une introduction récente et limitée, voire limitée à une seule origine. Seules deux de ces populations montrent cependant une différenciation plus forte, et sont toutes deux situées sur le front actuel d'expansion en direction des Alpes du Sud. L'histoire invasive des espèces exotiques sur Cèdre et sapins apparaît donc largement différente.

#### **1.4. Impact avant tout quantitatif sur la régénération naturelle des peuplements forestiers**

L'impact additionnel des espèces exotiques invasives sur le potentiel de régénération naturelle des sapinières européennes est conséquent au plan quantitatif. Alors que dans les années 1980, l'attaque de l'espèce native *M. suspectus* dépassait très rarement 15% des graines pleines d'un peuplement (Roques, 1983), des pourcentages d'attaque supérieurs à 50% ne sont plus rares (17.6% des cas), dus à l'arrivée des espèces exotiques. Il convient cependant de prendre en compte la possibilité de développement dans les graines non fécondées qui peut aboutir à une surestimation du taux d'attaque (cf. ci-dessus).

En revanche, l'impact qualitatif sur le pool génétique des sapinières semble plus limité. On a ainsi cherché à savoir si certains génotypes et / ou certains systèmes de reproduction sont préférentiellement attaqués par l'espèce invasive et si cela peut modifier la structure génétique du peuplement. Sur deux sites expérimentaux (Montagne de Lure et Mt Ventoux), où sont présents *Megastigmus suspectus* et *M. rafni*, on a génotypé séparément l'endosperme et de l'embryon de 240 graines pleines non infestées sur 12 arbres à l'aide de quatre marqueurs microsattelites chloroplastiques afin de préciser de préciser le système de reproduction (allogamie vs allogamie, nombre de pères contribuant à la descendance). Les tests génétiques sur ces arbres ont révélé que la plupart des semenciers sont allofécondés, notamment dans les zones de faible densité en sapin où l'on s'attendait au contraire à ce qu'il soit fort, mais aussi que les arbres les plus autofécondés ne sont pas plus sensibles à la pression des *Megastigmus* que les autres.

#### **1.5. Définition de méthodes de surveillance à l'importation des graines forestières infestées**

Sur un plan général, on a montré que l'éloignement taxonomique des essences natives vis-à-vis de l'hôte d'origine constitue un critère pertinent pour estimer la probabilité d'installation et l'importance des dégâts prévisibles des différentes espèces d'insectes exotiques associées aux arbres forestiers (Roques *et al.* 2006).

La législation européenne n'implique pas de contrôle systématique de l'infestation éventuelle des lots de graines importées. Nous avons compilé l'ensemble des interceptions d'organismes exotiques de 1995 à 2004 en Europe et montré que la liste ne comporte que 4 interceptions de *Megastigmus* ! (Roques et Auger-Rozenberg, 2006). On a mis au point des méthodes simples de surveillance à l'importation de graines forestières infestées. Cela a consisté à radiographier des lots de graines importées depuis d'autres continents et identifier l'état sanitaire des graines (pleines, vides, infestées par des insectes). Des lots de 50 graines de chaque catégorie ont ensuite été pesés et leur volume mesuré par analyse d'image afin de déterminer leur densité. On a ensuite cherché des liquides ou mélanges de liquides de densité permettant une séparation simple et non onéreuse des graines infestées en fonction de leur densité propre, et testé leur inocuité pour les graines. Des graines de 43 espèces appartenant aux genres *Abies*, *Pinus*, *Picea*, *Larix*, *Pseudotsuga*, *Tsuga*, *Cedrus*, *Juniperus*, et *Rosa*, en provenance de Chine, du Mexique, des USA et du Canada, et du Liban. Dans la grande majorité des cas (30), le non-recouvrement des densités de graines pleines et infestées a