

Rapport d'expertise 2020

Analyses génétiques du cheptel d'abeilles de la Nouvelle Calédonie



Responsable scientifique :

L. Garnery

UMR 9191

Laboratoire Evolution Génomes Comportement et Ecologie

Bât 13, avenue de la terrasse

91198 Gif-sur-Yvette

Mots clés: *Apis mellifera* / biodiversité / structure génétique / introgressions génétiques / conservatoire génétique d'abeilles

INTRODUCTION :

L'aire de répartition naturelle de l'abeille mellifère, *Apis mellifera*, s'étend à l'Afrique, à l'Europe et au Moyen-Orient. Dans son aire de distribution d'origine, 26 à 29 sous-espèces (ou races géographiques) ont été décrites sur la base de caractères morphologiques, écologiques et comportementaux. Cette espèce couvre donc une aire géographique très vaste et montre une variabilité morphologique et génétique très structurée. Une partie de la structuration observée correspond à des adaptations locales (climats, flores, parasites).

D'après des données de morphométrie et de paléogéographie, Ruttner *et al.* (1978, 1988) ont suggéré l'existence de 4 lignées évolutives chez l'abeille, chacune regroupant plusieurs races géographiques: la lignée M (races ouest-méditerranéennes), la lignée A (races africaines), la lignée C (races nord-méditerranéennes), et la lignée O (races proche et moyen-orientales).

Les résultats obtenus par l'analyse du polymorphisme de l'ADN mitochondrial (ADNmt) ont confirmé la plupart des conclusions de Ruttner. La lignée M est limitée à l'Europe de l'Ouest, et ne comporte que deux races, *A. m. mellifera* (« l'abeille noire ») et *A. m. iberiensis* (Garnery *et al.*, 1992, 1995). *A. m. mellifera*, est trouvée partout en Europe au nord et à l'ouest de l'arc alpin, tandis que *A. m. iberiensis* est limitée à l'Espagne.

La race d'abeille indigène présente en France est *A. m. mellifera*.

D'autres races sont présentes autour de la France :

- en Espagne, *A. m. iberiensis* est une race proche de *A. m. mellifera*, dont elle a longtemps été considérée comme une forme locale (Goetze, 1964). Elle fait partie de la lignée M.

- en Italie, *A. m. ligustica* appartient à la lignée C, et s'hybride avec *A. m. mellifera* dans les vallées alpines (Sheppard and Berlocher, 1985).

- en Allemagne, *A. m. carnica*, qui appartient également à la lignée C, a été importée massivement il y a quelques dizaines d'années, et a pratiquement remplacé les populations endémiques d'*A. m. mellifera* (Kauhausen-Keller and Keller, 1994). La situation est quasiment identique en Suisse, et au Luxembourg, où les abeilles de la lignée synthétique Buckfast ont été particulièrement introduites ces dernières années.

Par ces frontières, la France est donc perméable, de façon naturelle, à des flux de gènes (liés à la migration naturelle) en provenance de colonies d'abeilles de la lignée C, appartenant aux races *ligustica* (dans le sud-est), *carnica* (dans l'Est) et à la souche synthétique Buckfast (au Nord-Est).

Sur son aire de répartition naturelle, la biodiversité génétique de l'abeille est structurée selon plusieurs facteurs incluant : l'histoire et la démographie des populations, l'adaptation aux conditions locales, les migrations naturelles et dans certains cas la durée de leur isolement.

Au cours des millénaires, les populations locales d'abeilles se sont, en particulier, adaptées à des conditions climatiques ou aux cycles de floraisons d'espèces végétales particulières, caractéristiques de certaines régions mettant en place une diversité naturelle importante. L'exemple le mieux étudié sur le plan scientifique est celui de l'écotype landais de l'abeille noire dont le cycle est particulièrement adapté à la floraison de la Bruyère callune.

Certaines pratiques agricoles conduisant à une diminution de la biodiversité végétale, ou à l'utilisation inadaptée de certains pesticides, ainsi que certaines pratiques apicoles, telles que les importations de reines et la transhumance des colonies, peuvent à long terme entraîner la disparition de ces potentialités adaptatives locales. Il est donc particulièrement important, et urgent, de caractériser ces populations d'abeilles bien adaptées au moyen d'outils performants (moléculaires, morphométriques, comportementaux,...), avant d'envisager leur préservation.

Des associations d'apiculteurs, dans plusieurs régions françaises, conscientes de la richesse de leur patrimoine apicole, ont d'ailleurs créés des conservatoires d'abeilles, ou s'approprient à le faire.

L'aire de répartition naturelle de cette espèce couvrant l'Afrique, l'Europe et le Proche-Orient, ce sont les importations par l'homme qui ont ensuite conduit à sa présence, puis à sa dispersion en Amérique et en Océanie. Dans le cas de la Nouvelle Calédonie, les premiers essaims auraient été amenés en 1848 par les pères Maristes. L'abeille noire commune d'Europe aurait été installée sur l'Île des Pins, Lifou et la grande terre.

Un bilan réalisé sur 25 colonies en 2008 sur Lifou et la grande terre fait état que l'essentiel des abeilles d'élevage a une forte dominante italienne (*Apis mellifera ligustica*, ou « abeille jaune » selon l'appellation locale). L'abeille italienne (*Apis mellifera ligustica*) a été introduite en Nouvelle-Calédonie par le Centre de Promotion d'Apiculture à partir de 1982 en provenance essentiellement d'Italie, d'Australie et de Nouvelle-Zélande. Les dernières importations ont eu lieu en 1995. L'hybride de l'abeille noire européenne et de l'abeille jaune italienne est l'abeille la plus fréquente sur la grande terre, l'Île des pins et Maré (Centre de Promotion de l'Apiculture).

Objectifs de l'étude :

Cette étude a plusieurs objectifs et s'inscrit dans le cadre général de l'analyse de la diversité morphologique et génétique des populations d'*Apis mellifera mellifera* (« abeille noire ») en France. A l'échelle nationale, le but est d'établir un bilan du cheptel français afin d'étudier l'impact de l'apiculture sur la structuration des populations d'abeilles afin de conserver au travers de la diversité des populations géographiques incluses dans le programme, le maximum de diversité naturelle observée. Cette étude sert donc de support scientifique à la création et au maintien de conservatoires génétiques d'abeilles. Dans le cas de ce travail, l'étude d'impact qui a été réalisée a pour objectif de caractériser la diversité et la structure génétique de la population d'abeilles de la Nouvelle Calédonie.

Ainsi, la collaboration engagée entre le Centre de Promotion de l'Apiculture, les apiculteurs de Nouvelle Calédonie et le laboratoire EGCE, a pour objectif de réaliser une étude d'impact visant à caractériser la diversité génétique de la population d'abeilles de Nouvelle Calédonie, et déterminer l'impact des pratiques apicoles sur la structuration de la diversité de la population.

La caractérisation de la structure génétique de cette population permettra d'estimer les paramètres de la diversité (estimateurs du niveau de variabilité de la population) et de caractériser le niveau d'introgession nucléaire et mitochondrial de la population d'abeilles. La connaissance de cette diversité permettra de mettre en place un protocole de gestion de la diversité génétique de cette population, qui à terme pourra servir de réservoir de gènes, dans des programmes de sélection.

L'équipe du laboratoire EGCE apportera ainsi une expertise qui permettra aux apiculteurs de l'Île et au Centre de Promotion de l'Apiculture, de mettre en place un programme de gestion de la diversité de cette population.

Principe de l'étude :

Les apiculteurs de Nouvelle Calédonie sous l'égide du centre de Promotion de l'Apiculture ont réalisés des prélèvements d'abeilles dans plusieurs dizaines de colonies. Cet échantillonnage a été envoyé à notre laboratoire pour analyses. Les analyses de l'ADN de ces abeilles que nous réalisons nous permettent de caractériser l'origine maternelle des colonies et les éventuelles hybridations qui ont eu lieu dans les populations. Dans le cas présent la population analysée n'appartient pas à l'aire de répartition naturelle de l'espèce.

L'étude aura donc pour objectif de déterminer l'origine génétique de la population d'abeilles de la Nouvelle Calédonie et de déterminer l'impact des importations d'abeilles sur l'Ile, s'il y en a eu. Enfin, si une zone de la répartition est intéressante pour la gestion et la conservation, il s'agira de définir les paramètres de la conservation c'est à dire d'estimer le niveau de variabilité de la population.

1/ Principe de l'échantillonnage

S'agissant d'une première étude, l'échantillonnage qui a été réalisé couvre la totalité de Grande Terre et quelques échantillons ont également été prélevés sur l'Ile des Pin et les Ile Maré et Ouvéa. Une abeille est prélevée par colonie, et l'échantillonnage a été réalisé en prélevant dans une ou quelques colonies de nombreux ruchers. Ce mode de prélèvement ne permet évidemment pas de caractériser de manière précise chacune des colonies de la zone, mais il permet d'avoir une idée précise de la diversité et de la structure génétique d'une population locale.

2/ Principe de l'approche moléculaire

Marqueurs moléculaires

Deux types de marqueurs moléculaires complémentaires sont utilisés en routine pour étudier la diversité génétique de la population : l'ADN mitochondrial (région intergénique COI-COII) et l'ADN nucléaire (14 locus microsatellites).

L'analyse de l'ADN mitochondrial nous permet de déterminer l'origine maternelle des colonies, et de réaliser une première estimation du niveau d'introgession à l'échelle de la population. L'analyse de l'ADN nucléaire nous permet de déterminer les niveaux d'introgession dans la population et, par là même, de sélectionner des colonies faiblement introgressées pour la constitution de conservatoires génétiques.

Etant donné que les analyses microsatellites sont très lourdes à réaliser puisqu'elles doivent être faites sur plus d'une dizaine de locus, elles ne sont généralement pas systématiquement réalisées sur toutes les abeilles. Par contre, lorsqu'il s'agit de déterminer précisément quelles colonies peuvent être intégrées dans un conservatoire d'abeilles, ou pour réaliser une analyse fine de la diversité génétique, le niveau d'analyse doit être beaucoup plus précis et l'estimation du niveau d'introgession de la population doit être réalisée avec les deux types de marqueurs. Dans ce dernier cas la caractérisation de l'abeille analysée est validée à la fois par l'analyse mitochondriale et par l'analyse microsatellite. Au cours de cette étude les deux types de marqueurs ont été utilisés pour caractériser la diversité génétique de la population d'abeilles de Nouvelle Calédonie.

L'ADN mitochondrial :

Un exemple d'études d'impacts réalisées avec l'ADNmt à l'échelle de la France est présenté en figure 1. Celle-ci montre que la proportion des types mitochondriaux appartenant aux différentes lignées évolutives est très hétérogène en France.

Les abeilles ayant une origine maternelle appartenant à la race *mellifera* (lignée évolutive M) restent très prédominantes, et représentaient 73 % des abeilles échantillonnées en 2006. Les abeilles des lignées évolutives C et O en représentent ensemble 26 %, et celles de la lignée A, seulement 1 %. Compte tenu de l'augmentation du commerce des reines à l'échelle mondiale ces dix dernières années, les niveaux d'importation évoluent rapidement dans certaines populations et risquent de conduire à la disparition de l'abeille locale, ce qui montre l'urgence de la mise en place des conservatoires génétique dans son aire de répartition naturelle.

En dehors des zones de frontières, la lignée M est la lignée qui est naturellement présente en France métropolitaine. La présence des abeilles des lignées C et O représente par conséquent le résultat des importations de reines qui ont eu lieu depuis des dizaines d'années, en particulier des races *ligustica*, *caucasica* et *carnica*, et, plus récemment, de la lignée synthétique Buckfast. L'origine des abeilles de la lignée A n'est pas forcément due à des importations, mais à la présence d'abeilles venant naturellement d'Espagne où cette lignée mitochondriale est très présente (Smith *et al.* 1991, Garnery *et al.*, 1998a et b, De la Rua *et al.* 2004).

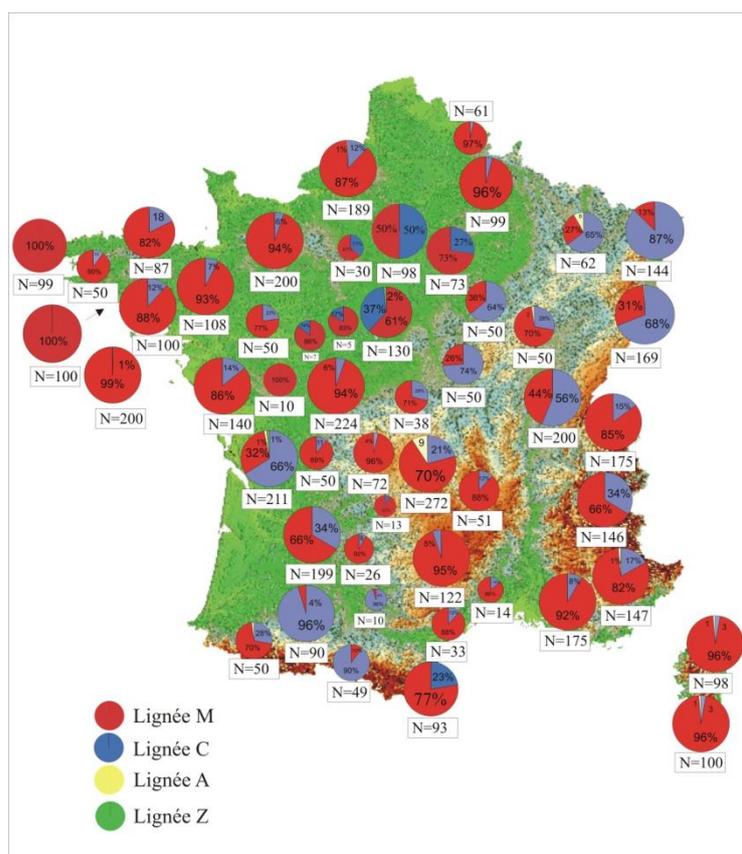


Figure 1 : Proportions des différentes lignées mitochondriales dans les régions françaises (lignée M, en rouge, lignées C et O en bleu, lignée A en jaune). Le nombre d'abeilles analysées est indiqué sous chaque camembert. Bilan du cheptel Français de l'abeille domestique (2004- 2006).

Cette analyse du cheptel français a également révélé que la diversité des haplotypes de la lignée ouest méditerranéenne est dans son ensemble importante et que la répartition de certains haplotypes M peut être différente selon les régions indiquant un début de différenciation à l'échelle nationale. Pour

chacune des régions étudiées, nous avons établi le profil génétique des origines maternelles des colonies et mis en évidence leurs caractéristiques particulières.

Les marqueurs microsatellites :

En complément à cette étude, l'analyse des marqueurs microsatellites permet de déterminer le niveau de diversité génétique à l'échelle de la population, ainsi que le niveau d'introgession (hybridation) de la population et de chacune des abeilles. La cartographie géographique de la diversité génétique devrait nous amener à définir la structuration géographique de la diversité de la population d'abeilles et à trier les colonies qui éventuellement ne seraient pas représentatives de la diversité locale afin de les éloigner de la zone conservatoire.

L'utilisation de plusieurs marqueurs microsatellites (en général une dizaine) permet donc, pour chaque abeille de déterminer le génotype multilocus. A partir de ce typage, il est possible d'établir le niveau de variabilité de la population, en estimant d'une part les fréquences alléliques dans la population pour chaque locus et d'autre part le niveau de variabilité de la population qui est représenté par le niveau d'hétérozygotie (proportion d'hétérozygotes dans la population). Lorsque pour un locus les allèles sont différents entre différentes souches d'abeilles, celui-ci est qualifié de diagnostique et permet d'estimer les introgessions nucléaires (niveau d'hybridation).

Matériels et Méthodes

1/ Echantillonnage des colonies :

1-1 / Echantillonnage de la population d'abeilles de Nouvelle Calédonie

Le CPA, assurant le suivi technique des apiculteurs de Nouvelle Calédonie, a pu répertorier un nombre important de colonies dans la zone d'étude. A partir de cet inventaire un échantillonnage a été réalisé sur la base d'une abeille par colonie. Ces abeilles sont conservées de manière individuelle dans un tube Eppendorf de 2 ml contenant de l'alcool à 96%. Après collecte, les différentes boîtes d'échantillons ont été envoyées au laboratoire EGCE du CNRS de Gif pour analyses, accompagnées de leurs feuilles d'échantillonnage respectives.

L'échantillonnage final porte sur 100 colonies, réparties dans 43 ruchers appartenant à 43 apiculteurs (figure 2).



Figure 2 : Carte de répartition des échantillons collectés pour l'étude. Chaque cercle blanc correspond à un rucher. Le nombre de colonies échantillonnées est indiqué pour chaque rucher.

Les abeilles utilisées pour l'analyse mitochondriale sont les mêmes que celles utilisées pour l'analyse nucléaire.

1-2/ Populations de référence des lignées M, C, O et A

Afin de replacer la population étudiée dans son contexte évolutif, **les échantillons de Lifou** ont été comparés à différentes populations de notre base de données. Ainsi, 17 populations appartenant à 12 races géographiques ont servi de référence pour les différentes analyses statistiques. Les populations de référence se répartissent de la manière suivante :

Lignée M (Ouest-Méditerranéenne) :

- Landes (Dpt40_1992) : *A.m.mellifera*, Sud-ouest France (Sabres), n = 45 abeilles
- Ouessant (1996) : *A.m.mellifera*, Conservatoire d'Ouessant ; n = 50 abeilles
- Belgique (1994) : *A.m.mellifera*, Hainaut Belge, n = 79 abeilles
- Pyrénées Atlantiques (Dpt64_1992) : *A.m.mellifera*, Sud-Ouest France, n = 39 abeilles
- Portugal (1994), *A.m.iberiensis*, n = 24 abeilles

Lignée C (Nord-méditerranéenne)

- Slovénie (2005), *A.m.carnica*, n = 91 abeilles
- Croatie (1998), *A. m. carnica*, n = 50 abeilles
- N_Grèce, 1992), *A.m.macedonica*, Grèce septentrionale (Chalkidiki), n = 30 abeilles
- S_Grèce (2004), *A.m.cecropia*, Grèce péloponèse (Argos), n = 49 abeilles
- Italie (1993), *A.m.ligustica*, Italie (Forli), n = 30 abeilles

Lignée O (Orientale)

- Arménie (1993), *A.m.armeniaca*, Arménie (Erevan), n = 17 abeilles
- Caucase (1999), *A.m.caucasica*, Géorgie (Tbilissi), n = 23 abeilles
- Turquie (2004), *A.m.anatoliaca* Turquie(Mugla), n = 48 abeilles
- Turquie (2004), *A.m.anatoliaca* Turquie(Tcanagolu), n = 48 abeilles

Lignée A (Africaine)

- Maroc (1992), *A.m.major*, Maroc (Al Hoceima), n = 28 abeilles
- Algérie (2004), *A.m.intermissa*, Algérie(Annaba), n = 31 abeilles
- Guinée (1992), *A.m.adansoni*, Guinée (mont Nimba), n = 22 abeilles

Groupe Z (Proche-Orient)

- Syrie, *A.m. syriaca*, Damas, Syrie, n = 96 abeilles

2/ Extraction des ADN totaux :

Les ADN totaux de chaque individu ont été extraits à partir de la tête de chaque abeille provenant de chacune des colonies échantillonnées. Les extractions ont été réalisées en utilisant la méthode du chelex de Walsh *et al.* 1991, modifiées par Garnery *et al.* 1995. Après dissection, chaque tête est broyée individuellement dans 600 µl de solution Chelex à 10%. Les protéines sont éliminées par un traitement à la protéinase K pendant 1h30 à 50 °c. Ensuite la protéinase est dégradée par chauffage des tubes à 95°c pendant 15 minutes. Cette dernière opération est répétée deux fois.

Les tubes d'extraction sont ensuite centrifugés pendant 10 minutes à 12 000 rpm et stockés à -20°c avant leur utilisation pour l'amplification d'ADN. Cette méthode permet de garder le maximum d'ADN en particulier lorsque l'échantillon à amplifier n'en contient que peu.

Ces ADN extraits sont utilisés aussi bien pour caractériser la diversité mitochondriale que la diversité nucléaire.

3/ Marqueurs moléculaires utilisés:

3-1/Le Test mitochondrial

L'ADN mitochondrial est une molécule circulaire contenue dans les mitochondries des cellules. Contrairement à l'ADN nucléaire, la transmission de cette molécule est uniquement maternelle. Chez l'abeille domestique, l'ADN mitochondrial a donc un très fort pouvoir de marqueur de colonie puisque toutes les ouvrières d'une même colonie ont la même mère.

Ainsi, l'étude d'une seule abeille suffit à caractériser la colonie. La transmission maternelle de la molécule en fait un marqueur particulièrement adapté à la détermination de l'origine maternelle d'une colonie et par conséquent de l'origine maternelle de la reine.

L'utilisation de l'ADN mitochondrial est basée sur le test COI – COII (Garnery *et al.* 1993). Un fragment de restriction présentant une variabilité de longueur en fonction de l'origine des lignées évolutives M (Ouest Méditerranéenne), A (Africaine), et C (Nord méditerranéenne) est utilisé en routine par notre équipe pour caractériser l'origine maternelle des colonies. Le test utilisé repose sur l'amplification de la région intergénique située entre les gènes des sous-unités I et II de la cytochrome oxydase, suivie de sa digestion par l'enzyme de restriction *DraI*. Ce test est particulièrement adapté aux estimations des introgressions maternelles dans la population (Garnery *et al.* 1995; 1998a; Franck *et al.* 1998, 2000, 2001; De la Rua *et al.* 1998).

Ce test permet de caractériser d'une part la lignée évolutive (M, A, C et O) d'origine de chaque colonie, mais également montre un polymorphisme intra-lignée, qui permet de déterminer, parmi l'ensemble des haplotypes observés, ceux qui peuvent éventuellement correspondre à des variants locaux. Ce test est également un premier reflet des introductions actuelles et passées d'abeilles allochtones. Il est à noter que les abeilles de la lignée O ne sont pas distinguables de celles de la lignée C par le test mitochondrial, mais le sont par le test microsatellites.

Pour une population d'abeilles donnée, l'étude de l'ADNmt permet donc de déterminer le niveau général d'introgression maternelle de la population, qui est formulé à partir du pourcentage d'abeilles provenant de chaque lignée évolutive (x_1 % de la lignée M, x_2 % des C et O et x_3 % de la lignée A).

3-1-1) Détermination de la taille de la région COI-COII

La région intergénique COI-COII de l'ADN mitochondrial (ADNmt) a été étudiée selon le protocole décrit par Garnery *et al.* (1993). La région intergénique, COI-COII est amplifiée par PCR (Polymerase Chain Reaction) en utilisant deux amorces (E2 et H2). Les produits de PCR sont ensuite déposés sur gel d'agarose 1.4% et sont soumis à une électrophorèse. La figure 3 montre les différents profils de migration obtenus après amplification de la région intergénique.

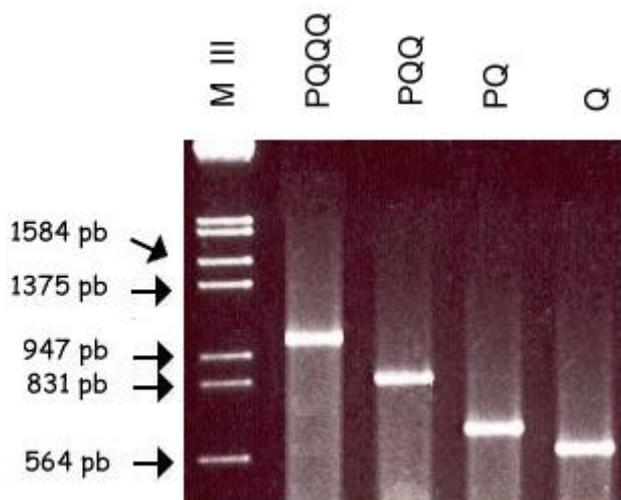


Figure 3: Profils de migrations sur gel d'agarose correspondant aux différentes longueurs de la région intergénique COI-COII.
- La longueur Q est caractéristique des lignées C et O.
- Les fragments de taille PQ, PQQ et PQQQ sont caractéristiques de la lignée M.
- Les structures PoQ et PoQQ sont confondues, sur gel d'agarose avec les PQ et PQQ mais caractérisent la lignée A.
Les colonies Buckfast sont en général originaires de la lignée C.

Afin de distinguer les lignées M et A (dont la différence de taille P/P₀ n'est pas visible sur gel d'agarose), et de caractériser de manière plus précise les différents haplotypes présents dans une population, les amplifiats obtenus vont être soumis à une digestion par l'enzyme de restriction *DraI*

3-1-2) Détermination des haplotypes après digestion par l'enzyme *DraI* :

Après digestion de restriction par l'enzyme *DraI* les produits de digestion sont déposés sur gel polyacrylamide (figure 4). Ceci permet de révéler qu'il existe un polymorphisme important à l'intérieur des lignées, qui montrent différents types mitochondriaux (haplotypes).

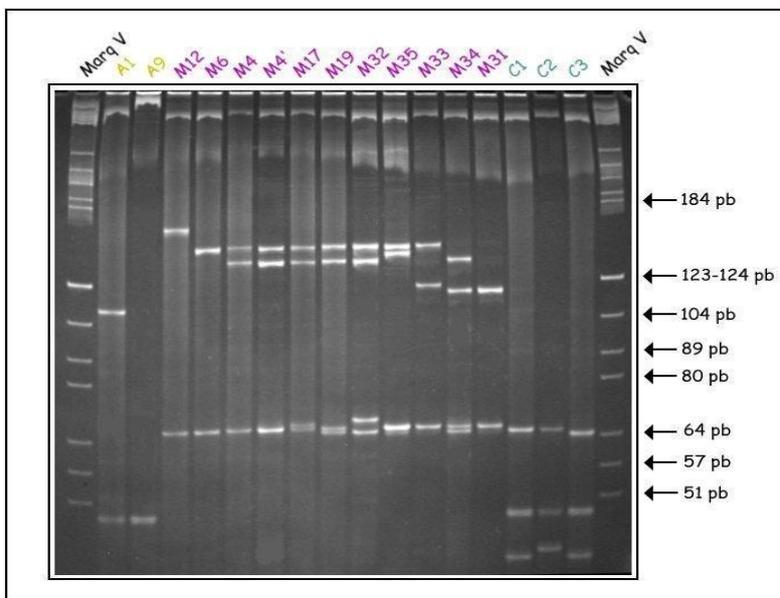


Figure 4: Exemple de profils de restriction de la région COI-COII après digestion par l'enzyme *DraI* (les lettres correspondent aux lignées évolutives, suivi du numéro d'haplotype dans la lignée). Les haplotypes sont codés en fonction de leur appartenance à une lignée et comportent chacun un numéro exprimant la diversité intra lignée (exemple M4 = haplotype 4 appartenant à la lignée M). Il est à noter que parmi les profils C, les haplotypes C1 et C3 sont les haplotypes rencontrés chez les abeilles carnica et constituent également la base maternelle de la lignée Buckfast du Frère Adam.

3-2/ Les marqueurs microsatellites :

Les marqueurs microsatellites sont des marqueurs à hérédité biparentale. Ils sont composés de séquences répétées (*ie* : [CA]_n) pour lesquels les formes alléliques sont liées au nombre de répétitions du motif. Le nombre de répétitions de chaque motif détermine la taille de l'allèle. Chaque allèle trouvé pour chacun des locus est donc caractérisé par une taille qui lui est propre, et c'est cette taille qui est analysée après passage au séquenceur automatique.

Chaque ouvrière (ou reine) possède deux allèles pour chaque locus, un provenant de la mère et l'autre provenant du père alors que les males haploïdes (issus d'œufs non fécondés) ne comporteront que l'allèle d'origine maternelle. Les allèles peuvent être soit différents (l'abeille est alors qualifiée d'hétérozygote à ce locus), soit identiques (dans ce cas elle est homozygote à ce locus). La proportion d'hétérozygotes dans une population est un indice de la diversité génétique de la population. La figure 5 illustre le profil de 2 individus (ouvrières) au locus A8, le premier individu est homozygote pour l'allèle 160, le second est hétérozygote pour les allèles 158 et 162.

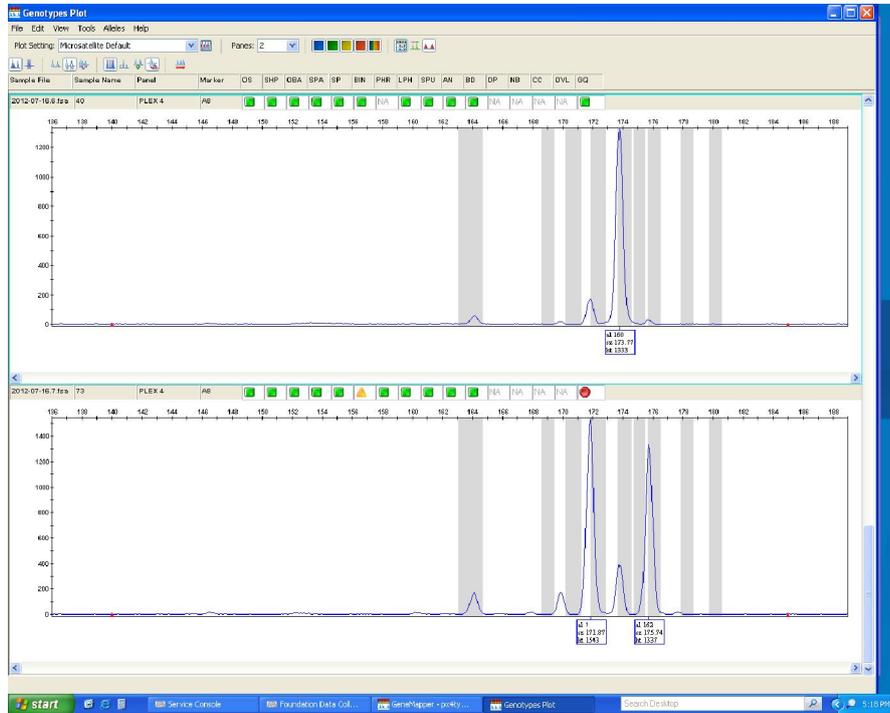


Figure 5 : Exemples de profils de migration au séquenceur automatique de deux ouvrières génotypées au locus A8. Le premier individu est homozygote pour l'allèle 160 et le second, hétérozygote, porte les allèles 158 et 162.

Au cours de l'évolution d'une espèce, l'effectif des populations d'abeilles peut varier et entraîner des phénomènes de dérives génétiques, qui vont fixer des allèles dans certaines populations et des allèles différents dans d'autres populations. C'est ce qui s'est produit lors des glaciations du quaternaire dans les différentes zones refuges que constituaient la péninsule ibérique, l'Italie, la Grèce et le Caucase. La figure 6 illustre les fréquences alléliques observées au locus A28 dans différentes populations des lignées évolutives M, C et O. Il apparaît clairement sur cette figure que les allèles 132 et 144 sont spécifiques des populations de la lignée M, et que les allèles 134 et 138 sont spécifiques aux lignées C et O. C'est à l'aide de ces locus diagnostiques et de ces allèles spécifiques (allèles diagnostiques) que sont estimés les niveaux d'introgression.

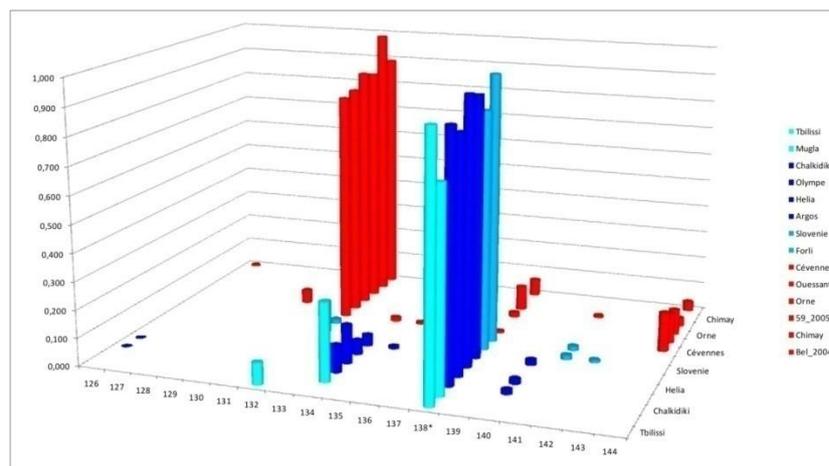


Figure 6 : histogramme des fréquences de 14 populations d'abeilles au locus A28. Le premier axe représente les différents allèles présents dans la population (représentés par leur taille), le second axe la fréquence de chacun des allèles et le troisième axe est celui des populations. Les populations des lignées O, C, et M sont représentées par des couleurs différentes : En bleu cyan pour la lignée O, en bleu foncé et bleu clair pour les populations de la lignée C (issues respectivement des refuges Grec et Italien) et en rouge pour la lignée M.

Dans les populations d'abeilles où les apiculteurs-éleveurs interviennent peu, les reines vierges et les mâles des ruchers environnants se fécondent naturellement, et les niveaux d'introgression évalués par

chacune des deux méthodes (ADN mitochondrial et microsatellites) ne sont pas sensiblement différents.

Par contre, dans le cas où des élevages intensifs de reines d'une race déterminée sont réalisés, alors que des mâles de différentes races sont présents dans les ruchers environnants, il pourra y avoir une différence entre les niveaux d'introgression maternel (caractérisés avec l'ADN mitochondrial) et paternel (caractérisés avec les marqueurs microsatellites). Par exemple, si l'apiculteur élève des reines noires, et qu'elles sont fécondées dans la nature par un mélange de mâles noirs et de mâles *ligustica* (liés à la présence de ruchers d'abeilles italiennes à proximité de ses ruchers), l'analyse de l'ADNmt des ouvrières qui descendent de ces fécondations ne montrera aucune introgression (« pur noir »), alors que l'ADN nucléaire (microsatellites) montrera des niveaux d'introgressions supérieurs pour des abeilles provenant de la même colonie.

Dans cette étude 14 locus microsatellites (A124, A43, A88, A24, Ap33, A8, A113, Ap43, A7, A28, Ap36, Ap55, Ap81 et Ap66) ont été utilisés. La plupart d'entre eux sont considérés comme particulièrement discriminants entre les lignées M et C (Garnery *et al.* 1998b).

Le protocole d'amplification de ces locus utilise les conditions générales décrites par Estoup *et al.* (1995), modifiées par Garnery *et al.* (1998b).

4/ Analyses statistiques des données :

Une population donnée appartient à une lignée particulière (M, C, A ou O) qu'il est possible de caractériser à partir des distances génétiques que l'on peut calculer entre cette population et des populations de « référence » appartenant à ces lignées. L'analyse de la matrice de distances entre populations nous permettra de déterminer la position de la population étudiée au sein de la diversité naturelle de l'espèce (représentée par les populations de référence).

Ce calcul de distance peut être réalisé d'une part entre toutes les populations pour connaître, la position de la population étudiée et d'autre part, entre tous les individus (colonies) de ces populations, ce qui permet de mettre en évidence une éventuelle hétérogénéité dans la zone étudiée et de caractériser la position de chaque abeille individuellement au sein de la diversité de l'espèce.

4-1/ Estimations des distances génétiques entre populations et entre individus :

Les distances génétiques qui séparent les populations les unes des autres ont été calculées à l'aide du logiciel POPULATIONS (version 1.2.21, Langella, 1999). Les distances entre populations (i) ont été calculées à l'aide de la formule de Cavalli-Sforza et Edwards (1967) qui constitue, avec la distance DA de Nei, la meilleure estimation de distance génétique pour les études populationnelles (Takesaki et Nei, 1996). Les distances entre individus (ii) ont été calculées à partir de la distance des allèles partagés ou distance DAS (Shared Allele Distance; Chakraborty et Jin, 1993).

4-2/ Analyse hiérarchique des populations : les arbres de proximité

La reconstruction des arbres de proximité génétiques a été réalisée à l'aide de l'algorithme du Neighbor-Joining (Saitou et Nei, 1987), et la visualisation des populations sur l'arbre a été réalisée avec le logiciel TREEMAKER (Cornuet *et al.*, 1999). Un regroupement de populations est validé par une valeur de bootstrap correspondant au pourcentage de chance de trouver ce regroupement à partir de 2000 tirages aléatoires effectués sur les individus.

4-3/Analyses en Coordonnées principales sur la matrice de distance entre populations:

L'arbre phylogénétique ne permettant pas de déterminer l'importance de tous ces regroupements dans leur ensemble et les uns par rapport aux autres, il est utile de réaliser une analyse multivariée (ACP-Analyse en Coordonnées Principales). Cette analyse, complémentaire a été effectuée avec le programme NUEES (version 0.8, Langella 2001) qui permet une visualisation rapide de l'emplacement des populations (ou des individus) les un(e)s par rapport aux autres grâce au logiciel graphique XGOBI (version 1.1).

4-4/ Analyse de la structure génétique de la population :

La structuration géographique d'une population peut être d'origine naturelle (ie. sélection, migration) ou d'origine humaine (ie. importations, transhumance). Cette structuration est déterminée par les estimations des fréquences alléliques et/ou haplotypiques, de la diversité haplotypique et des niveaux d'hétérozygoties des populations. Ces derniers estimateurs ont été calculés respectivement à l'aide des formules de Nei&Tajima (1981) et Nei (1978). Afin d'obtenir l'ensemble de ces paramètres ainsi que celui du comportement reproducteur de la population, des tests exacts (équilibre de Hardy-Weinberg et déséquilibres de liaison) ont été réalisés à l'aide du programme GENEPOP (version 3; Raymond et Rousset, 1995).

Le classement des colonies a été obtenu à l'aide du logiciel GENECLASS (version 1.0.02; Cornuet *et al.*, 1999). Ce programme permet d'affecter les colonies à des populations de référence, c'est à dire de calculer des probabilités d'appartenance de chaque individu à un échantillon (race géographique, ou lignée évolutive), probabilités fondées à partir des méthodes fréquentielle (Paetkau *et al.*, 1995), ou Bayésienne.

Une analyse complémentaire de la structure génétique de la population consiste à déterminer sans a priori le nombre de groupes (K) génétiquement homogènes en utilisant un algorithme Bayésien implémenté dans le logiciel STRUCTURE (Pritchard *et al.*, 2000). L'analyse est effectuée sur un total de 1039 échantillons comprenant les échantillons de l'étude ainsi que les échantillons issus des populations de référence des lignées M ; A ; C ; O ; Z. Nous avons effectué 10 répliques pour chaque valeur de K comprise entre 1 et 10. Afin d'identifier le nombre de groupes génétiquement homogènes (choix du K le plus probable), nous calculons la statistique du ΔK décrite par Evanno *et al.* (2005). Enfin, le logiciel DISTRICT 1.1 (Rosenberg, 2004) permet de représenter graphiquement les résultats.

Résultats :

Caractérisation de l'origine maternelle des ouvrières:

1) Détermination de la taille de la région COI-COII

Sur les 100 colonies échantillonnées, les 100 colonies ont pu être amplifiées et analysées. Un exemple de gel de migration en agarose des produits de PCR sont présentés en annexe 1. Le tableau 1 présente un exemple de résultats obtenus avec le test mitochondrial. La totalité des résultats obtenus sur l'ensemble des colonies est présentée dans l'annexe3.

Echantillon	Long	Haplot	
NC_01	Q	C 2	*
NC_02	Q	C 2	*
NC_03	Q	C 1	*
NC_04	Q	C 2	*
NC_05	Q	C 2	*
NC_06	Q	C 2	*
NC_07	Q	C 2	*
NC_08	Q	C 1	*
NC_09	Q	C 2	*
NC_10	Q	C 2	*
NC_11	Q	C 2	*
NC_12	Q	C 2	*
NC_13	Q	C 1	*
NC_14	Q	C 1	*
NC_15	Q	C 2	*
NC_16	Q	C 2	*
NC_17	PQQ	M 4	*
NC_18	PQQ	M 4	*

Tableau 1 : Exemples de résultats de l'analyse mitochondriale. La première colonne correspond au numéro de l'échantillon. La seconde colonne à la longueur du fragment amplifié (organisation structurale de la région intergénique). La troisième colonne présente le numéro d'haplotype correspondant à un profil de migration particulier. Ce numéro d'haplotype est précédé par une lettre correspondant à la lignée évolutive d'origine.

2) Détermination des haplotypes après digestion par l'enzyme *DraI*

Des exemples de gels de migration en poly-acrylamide, après digestion du produit de PCR par l'enzyme *DraI*, sont présentés en annexe 2. Des exemples d'interprétations des profils de migration sont présentés en troisième colonne du tableau 1. Dans cette colonne la lettre indique la lignée d'origine de l'échantillon (M, A ou C) et le numéro correspond au numéro d'haplotype dans la lignée.

L'analyse de la population d'abeilles de Nouvelle Calédonie a permis de révéler la présence de 4 haplotypes (profils de migration) différents appartenant à deux lignées évolutives différentes. Parmi ces haplotypes, 2 appartiennent à la lignée Ouest méditerranéenne (M) et 2 sont originaires de la lignée Nord méditerranéenne (C).

Il est à noter qu'aucun haplotype originaire des lignées A et Z n'a été détecté dans la population.

Parmi les 100 colonies échantillonnées en Nouvelle Calédonie, 79% ont des profils typiques de la lignée C et 21% ont des profils mitochondriaux de type M (figure 6). Le tableau 2 présente les fréquences de chacun des haplotypes dans la population échantillonnée.

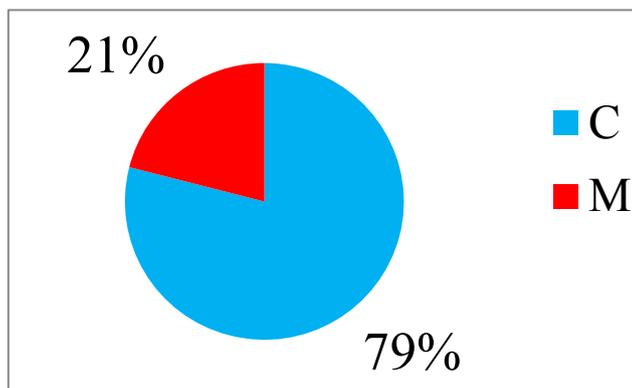


Figure 6 : Diagramme des fréquences des différentes lignées dans la population.

Haplo.	Freq.
C 1	0,11
C 2	0,68
M 4	0,20
M 7	0,01

Tableau 2 : Fréquence des différents haplotypes observés dans la population.

La figure 7 montre la répartition géographique des haplotypes dans la zone échantillonnée et par rucher. Sur cette figure chaque colonie échantillonnée est représenté par un hexagone. Les haplotypes de la lignée M sont en rouge, ceux de la lignée C en bleu.

Compte tenu de la fréquence importante des haplotypes de la lignée Nord-Méditerranéenne, les haplotypes M apparaissent dispersés sur Grande terre et sont présents aussi bien au Sud qu'au Nord de l'Ile. Aucun type M n'a été observé sur les Ouvéa et Maré ni sur l'Ile des pins

Diversité des haplotypes C :

La population de Nouvelle Calédonie est composée de 79% de colonies appartenant à la lignée C.

Parmi les types C, on observe 2 variants. Ces deux haplotypes, C 1 et C2 montrent des fréquences respectives de 11% et 68%.

L'haplotype C1 occupe une aire de répartition importante dans sa lignée d'origine puisqu'il est observé depuis le nord de l'Italie jusqu'au Caucase. Il peut donc correspondre à des importations d'*A.m. carnica*, d'*A.m. cecropia*, ou encore d'*A.m. caucasica*. Il est donc peu informatif quant à son origine.

L'haplotype C2 est essentiellement observé en Italie ce qui montre une origine Italienne des importations. Ce type mitochondrial représente 68% des colonies qui portent cet haplotype d'origine Italienne.

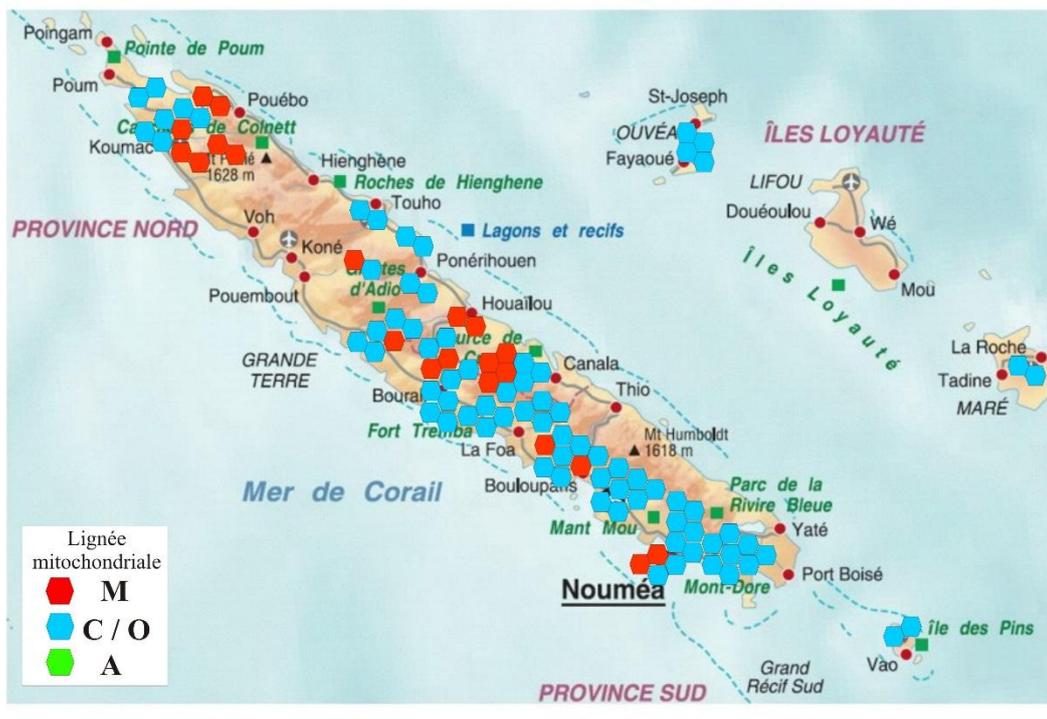


Figure 7 : montrant la localisation des haplotypes M et C dans la zone échantillonnée. La répartition des types mitochondriaux est représentée en fonction des différents ruchers (hexagones collés). Le types mitochondriaux d'origine M sont en rouge, les types C (Nord-méditerranéens) en bleu, le types A (africains) en vert et Z (proche-orient) en jaune (ces deux derniers types sont absents de l'étude).

Diversité des haplotypes M :

La figure 8 présente les fréquences des différents haplotypes dans la population étudiée. L'analyse de la population de Nouvelle Calédonie met en évidence la présence de 2 haplotypes appartenant à la lignée mitochondriale M.

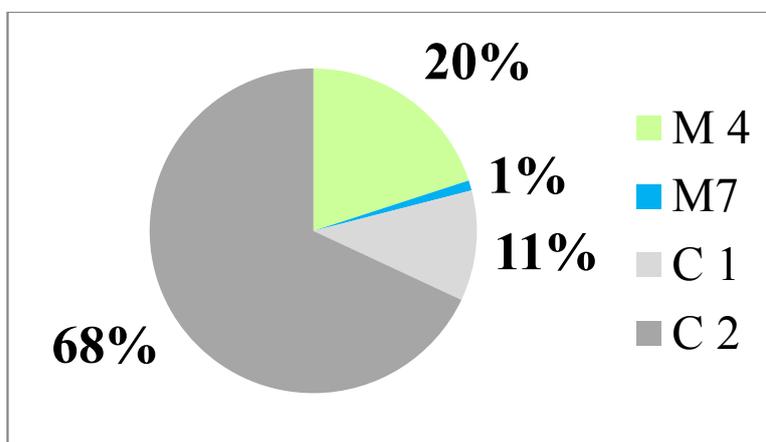


Figure 8 : Diagramme présentant les fréquences des 4 différents haplotypes M de la population de Nouvelle Calédonie

L'haplotype M le plus fréquent est le M 4, et représente 20 % des haplotypes de la population échantillonnée et 95 % des haplotypes M. Il correspond à l'haplotype le plus commun observé en France métropolitaine, avec les haplotypes M4' (absent de cette étude) et M 6 (absent de cette étude). L'haplotype M7 représente 5% des haplotypes M (seulement une observation). Cet haplotype est également trouvé en Italie dans son aire de répartition d'origine

Répartition géographique des haplotypes de la lignée M:

La figure 9 illustre la répartition géographique des haplotypes M observés dans la zone d'étude. Comme dans le cas précédent chaque colonie échantillonnée est représentée par un hexagone. Une couleur est affectée pour chacun des haplotypes de la lignée M. Les haplotypes de la lignée C sont représentés en tons de gris.

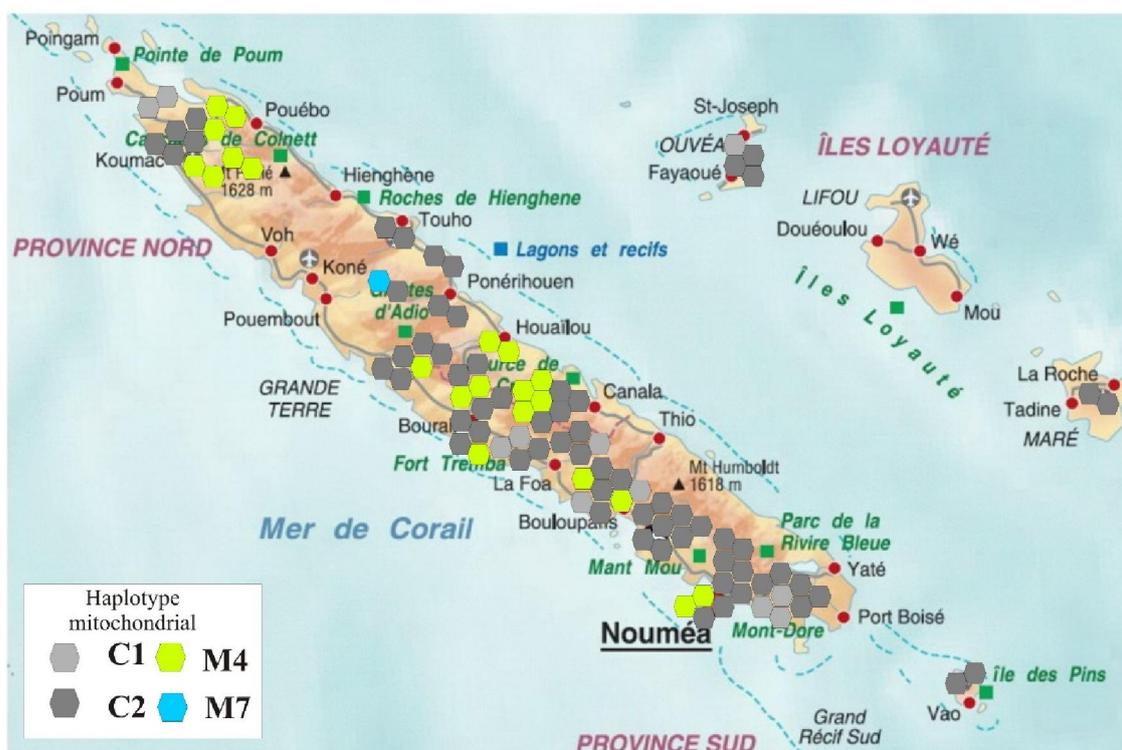


Figure 9 : Cartographie de la diversité mitochondriale intra-lignée. Chaque haplotype est représenté par une couleur différente. Les haplotypes de la lignée M sont représentés en couleur, ceux de la lignée C en niveaux de gris.

Diversités haplotypiques

L'indice de diversité haplotypique est un paramètre important en matière de conservation. Sa valeur est comprise entre 0 (0 montrant l'absence de diversité) et 1 (le maximum de diversité). Il permet d'estimer la diversité mitochondriale observée à l'échelle d'une population ou d'un rucher à un instant t. Il s'agit d'un des paramètres que l'on estime lors de l'étude d'impact et qui sera important de suivre afin de vérifier l'efficacité de la conservation (en cas de perte de diversité cet indice risque de diminuer). Dans le cas de populations ayant subi des importations cet indice est estimé de deux manières différentes :

Le niveau de *diversité haplotypique brute* de la population est représentatif de la diversité totale comprenant la diversité des haplotypes locaux et la diversité des haplotypes importés par l'apiculture (diversité artificielle). Il a donc tendance à surestimer le niveau de diversité originelle de la population lorsque des importations ont été réalisées de manière importante. Ce paramètre est estimé à **0,481** pour la population d'abeilles de Nouvelle Calédonie dans sa totalité. Compte tenu des introductions d'abeilles Italiennes qui ont eu lieu après les premières introductions d'*A. m. mellifera* la diversité haplotypique de cette population peut être considérée comme faible.

Dans le cadre de la conservation de la diversité locale, il est préférable de raisonner sur l'indice de diversité haplotypique corrigée correspondant essentiellement à la diversité locale de la population (les haplotypes d'importation sont éliminés du calcul). Si l'on considère que des abeilles de lignée M ont initialement été introduites en Nouvelle Calédonie, les haplotypes C1, et C2 ont été éliminés du calcul car ils sont considérés comme introgressants pour la population initiale. La diversité haplotypique

corrigée est ainsi estimée à 0,000 puisqu'il ne persiste qu'un seul haplotype de la lignée M (M4). En effet l'haplotype M 7 est considéré comme représentatif de la lignée C (origine Italienne probable).

Pour conclure sur la diversité mitochondriale, la population d'abeilles de Nouvelle Calédonie échantillonnée montre donc 79% de types mitochondriaux appartenant à la lignée C.

Les haplotypes considérés comme importés par rapport à la population originelle se répartissent comme suit :

- 69 % d'abeilles Italiennes (haplotypes C2 et M7)
- 11 % d'abeilles de la lignée Nord méditerranéenne (*carnica*, *cecropia*) ou O (*caucasienne*) (types C1) ou Buckfast.

Considérant que la population d'origine était probablement composée d'abeilles de la lignée M, cette population exprime donc un niveau d'introgession mitochondrial par des abeilles de la lignée C de 80%. La diversité haplotypique des abeilles introduites originellement est nulle (0,00). Si l'on considère que la diversité originelle était la même que celle de l'île de Lifou, il est possible que les vagues d'importations d'abeilles italiennes qui ont suivi l'introduction d'abeilles noires sur l'île aient contribué à faire chuter la diversité haplotypique originelle. Cette diversité originelle était toutefois faible en relation avec un effet de fondation lors des premières introductions sur l'île.

Ainsi les principaux résultats obtenus avec l'ADNmt montrent que :

- i) les abeilles ayant une origine maternelle appartenant à la lignée C ont en proportion importante mais non exclusive sur l'île et représentent 79 % des colonies.
- ii) une diversité haplotypique corrigée parmi les plus faibles.

Diversité des marqueurs nucléaires (microsatellites)

Comme dans le cas de l'ADN mitochondrial, les résultats ont été analysés dans un premier temps dans un contexte global (à l'échelle de l'espèce) afin de replacer la population étudiée au sein de la diversité de l'espèce. Dans un second temps, les résultats ont été analysés dans le contexte local, c'est à dire à l'échelle de la population, afin de déterminer les paramètres importants pour la conservation de la diversité génétique et la gestion de la diversité de la population d'abeilles de Nouvelle Calédonie.

1/ Analyse globale :

1-1/ Place de la population de Lifou dans l'arbre de proximité génétique :

Afin de replacer la population de Nouvelle Calédonie dans le contexte de diversité à l'échelle de l'espèce, une matrice de distance a été calculée à partir des données des marqueurs microsatellites entre l'ensemble des populations de l'étude (Nouvelle Calédonie et populations de référence des différentes lignées). La figure 10 présente le résultat de l'analyse hiérarchique de ces populations (Neighbor-Joining sur les distances inter-populations).

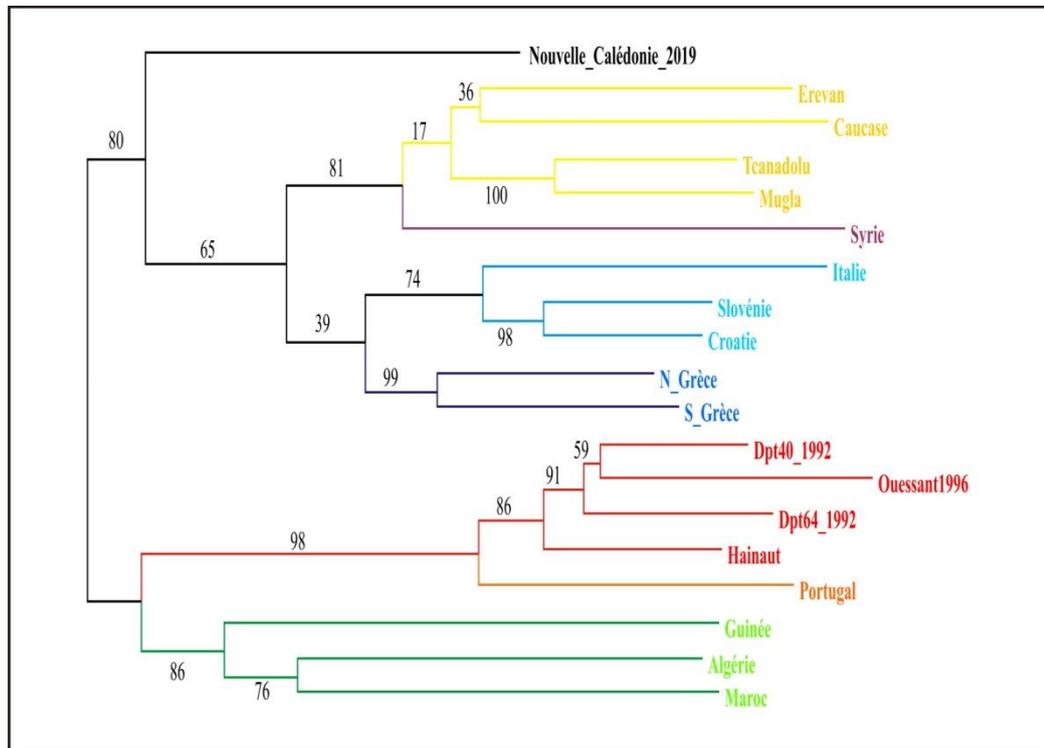


Figure 10: Arbre de classification hiérarchique calculé à partir des distances de Cavalli-Sforza et Edwards (1967) et de 14 loci microsatellites. Les valeurs de « Bootstrap », notées en pourcentages, ont été obtenues avec 2000 itérations d'un ré-échantillonnage aléatoire des individus (Garnerly et al., 1995).

Cette figure montre clairement que les populations de référence se répartissent dans 5 groupes correspondant aux 5 grands groupes évolutifs :

- La lignée M : représentée par les populations des Landes (Dpt40_1992), de l'île d'Ouessant (Ouessant_1996), des Pyrénées Atlantiques (Dpt64_1992) et de Belgique (Hainaut) pour *Apis mellifera mellifera* ; et Portugal (1996) pour *A.mellifera iberiensis*.
- La lignée C : représentée par les populations d'Italie, de Slovénie de Croatie et de Grèce.
- La lignée A : représentée par les populations de Guinée, d'Algérie et du Maroc.
- La lignée O : représentée par les populations de Turquie (Mugla, Tcanadolu), d'Arménie (Erevan) et du Caucase (Géorgie).
- Le groupe Z (voir Alburaki et al. 2011): représenté par la population de Syrie qui sort à la base des lignées C et O.

Les lignées M, A et l'ensemble C et O sont en général bien distinguées entre elles avec des valeurs de bootstrap sur les branches comprises entre 80 et 100. Le groupe Z est situé à la base de l'ensemble C/O.

L'étude hiérarchique montre clairement que la population d'abeilles de Nouvelle Calédonie a une position intermédiaire dans l'arbre et vient se placer à la base des lignées C et O mais très séparée de celles-ci. Les valeurs de bootstrap situées sur les branches en amont et en aval de l'arbre sont respectivement de 80% et 65% ce qui vient renforcer la position de la population dans l'arbre (population éloignée des lignées M et A et plus proche des lignées C et O).

Cette population se distingue donc des populations de référence des 5 lignées M, A, C, O et Z.

1-2/ Analyse des données inter-populations

Les projections des populations issues de l'Analyse en Coordonnées Principales (ACP) réalisée sur la matrice des distances de Cavalli-Sforza comprenant la population de Nouvelle Calédonie et les populations de référence est représentée en figure 11.

Les deux premiers axes de l'ACP absorbent 62 % de la variance génétique totale ce qui est important dans la représentation de la diversité génétique dans un espace comprenant 18 dimensions. Le premier

axe de l'ACP qui représente 45,5% de la variance exprimée, oppose les populations de références C (en bleu), O (en jaune) et Z (en violet) situées à droite de la figure, aux populations références de la lignée M (situées à gauche). Ce premier axe montre très clairement que 45,5 % de la variabilité génétique totale exprimée est lié à une séparation entre les populations de référence M (Dpt40_1992, Dpt64_1992, Belgique, etc...) et les populations de référence C, O et Z (Grèce, Italie, Buckfast, etc.). Sur ces deux premiers axes, l'ensemble des populations de la lignée M forme un groupe compact. L'échantillon représentant la population de Nouvelle Calédonie est situé à égale distance entre la Lignée M et les lignées C, O et Z.

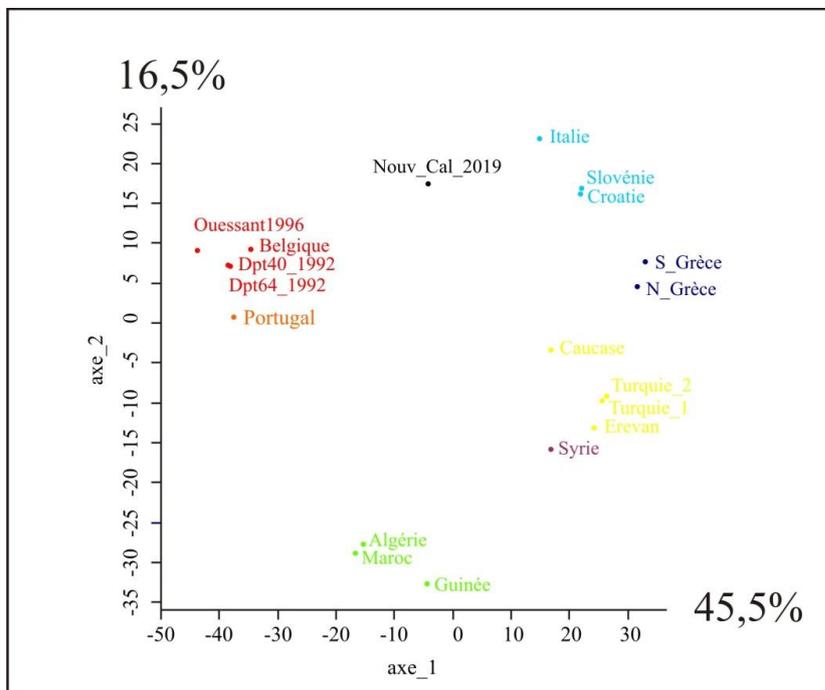


Figure 11 : Projection selon les axes 1 et 2 de l'Analyse en Coordonnées Principales (ACP) des populations de références des lignées M (en rouge : Dpt40_1992, Ouessant_1996, Dpt64_1992 et Belgique ; Portugal en orange), C (en Bleu : Nord_Grèce, Sud_Grèce, Slovenie Croatie et Italie), A (en Vert : Algérie, Maroc, et Guinée), O (en Jaune : Turquie Arménie et Géorgie), Z (en violet : Syrie). La population de d'abeilles de Nouvelle Calédonie est représentée par un point noir.

Le deuxième axe, exprime 16,5% de la variance totale du système. Les projections des populations selon cet axe opposent clairement les populations africaines (lignée A) aux autres lignées évolutives. La position très haute sur le graphique de la population de Nouvelle Calédonie sur cet axe montre clairement qu'il n'y a pas d'influence notable des populations africaines sur la structure de la population d'abeilles de Nouvelle Calédonie. En effet celles-ci qui sont plutôt positionnées à l'opposé en bas de l'axe 2.

Le troisième axe de l'analyse (figure 12, qui représente 11,6 % de la variance du système, oppose clairement les populations de la lignée O (Turquie, Arménie et Caucase), Z (Syrie) et de la lignée M aux populations C et A. La position de la population d'abeilles de Nouvelle Calédonie reste très proche des populations de la lignée C sur cet axe, et montre que l'influence d'importations potentielles provenant des lignées O et Z a été faible voire négligeable.

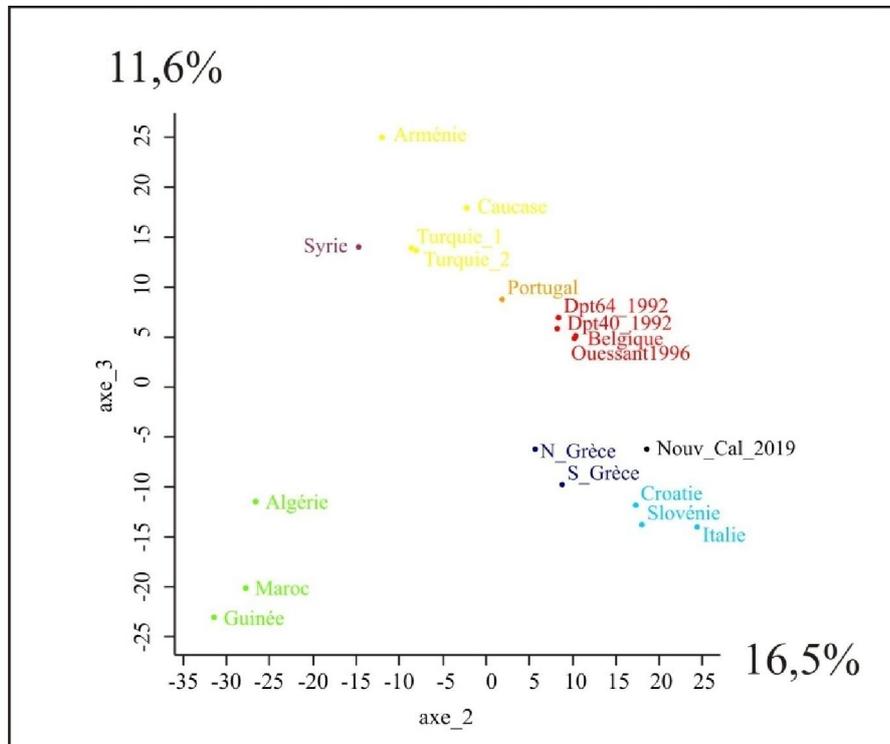


Figure 12 : Projection selon les axes 2 et 3 de l'analyse en Coordonnées Principales (ACP) des populations de références des lignées M (en rouge : Dpt40_1992, Ouessant_1996, Dpt64_1992 et Belgique ; en orange, Portugal 1996), C (en Bleu : Nord_Grèce, Sud_Grèce, Croatie, Slovénie et Italie), A (en Vert : Algérie, Maroc, et Guinée), O (en Jaune : Turquie Arménie et Caucase), Z (en violet : Syrie). La population de Nouvelle Calédonie est représentée par un point noir.

2/ Analyse à l'échelle locale : structure génétique de la population

2-1/ Diversité génétique de la population

Les fréquences alléliques pour chacun des 14 loci sont présentées dans le tableau 3. Dans ce tableau, chaque case représente un des locus étudiés. Pour chaque locus la première colonne représente le nom du locus, la seconde colonne donne la taille des allèles observés dans la population de Nouvelle Calédonie et la troisième colonne exprime la fréquence de chacun de ces allèles dans cette population. Les deux dernières lignes de chaque cadre représentent respectivement l'hétérozygotie observée (H_o) et l'hétérozygotie calculée sous l'hypothèse de Hardy-Weinberg (H_c) qui correspondent aux paramètres de diversité génétique.

Locus	Allele	Nouv. Cal.	Locus	Allele	Nouv. Cal.	Locus	Allele	Nouv. Cal.
B124	(pb)	(n = 192)	Ap33	(pb)	(n = 200)	Ap81	pb	(n = 200)
	216	0,391		225	0,073		128	0,432
	218	0,038		227	0,063		134	0,099
	220	0,141		229	0,016		136	0,391
	222	0,005		233	0,047		138	0,078
	224	0,359		235	0,115	Ho		0,667
	226	0,027		237	0,167	Hc		0,648
	228	0,005		239	0,057	Locus	Allele	Nouv. Cal.
	230	0,027		241	0,141	A7	(pb)	(n = 196)
	234	0,005		243	0,260		104	0,005
Ho		0,782		245	0,052		107	0,053
Hc		0,699		247	0,005		111	0,421
Locus	Allele	Nouv. Cal.		249	0,005		114	0,016
B24	(pb)	(n = 200)	Ho		0,844		116*	0,121
	98	0,500	Hc		0,858		118*	0,058
	106	0,057	Locus	allele	Nouv. Cal.		120*	0,116
	108*	0,438	Ap55	pb	(n = 200)		122*	0,016
	110	0,005		173	0,130		132*	0,063
Ho		0,604		175	0,177		134	0,042
Hc		0,558		177	0,036		136	0,021
Locus	Allele	Nouv. Cal.		179	0,224		142*	0,011
A28	(pb)	(n = 200)		181	0,151		148	0,032
	132	0,365		183	0,010		150	0,011
	138*	0,609		185	0,052		162	0,011
	143	0,026		187	0,219		174	0,005
Ho		0,448	Ho		0,656	Ho		0,832
Hc		0,498	Hc		0,831	Hc		0,785

Locus Ap66	Allele pb	Nouv. Cal. (n = 200)	Locus Ap36	Allele (pb)	Nouv. Cal. (n = 184)	Locus A113	Allele (pb)	Nouv. Cal. (n = 200)
	84	0,026		125*	0,290		202	0,271
	92	0,016		129	0,006		214*	0,125
	94	0,536		143	0,017		216	0,010
	100	0,411		147	0,011		220	0,510
	101	0,005		161	0,006		222	0,010
	103	0,005		165	0,369		226	0,016
Ho		0,448		167	0,097		230	0,026
Hc		0,545		169	0,057		232	0,010
Locus A88	Allele (pb)	Nouv. Cal. (n = 200)		171	0,034		236	0,021
	143	0,026		173	0,085	Ho		0,667
	146	0,542		177	0,006	Hc		0,652
	152*	0,021	Ho		0,693	Locus Ap43	Allele (pb)	Nouv. Cal. (n = 196)
	154*	0,406	Hc		0,762		135	0,053
	156	0,005	Locus A43	Allele (pb)	Nouv. Cal. (n = 200)		137	0,404
Ho		0,375		127*	0,036		143*	0,043
Hc		0,543		128	0,578		145*	0,404
Locus A8	Allele (pb)	Nouv. Cal. (n = 200)		140	0,068		147*	0,021
	148	0,135		141*	0,255		149	0,048
	156	0,292		143	0,057		167	0,005
	158*	0,047		145	0,005		179	0,021
	160*	0,177	Ho		0,573	Ho		0,691
	162*	0,240	Hc		0,595	Hc		0,669
	164*	0,099						
	166*	0,010						
Ho		0,800						
Hc		0,708						

Tableau 3 : présentant les paramètres de variabilité de la population de Nouvelle Calédonie pour chacun des 13 loci étudiés.

Le nombre moyen d'allèles par locus observé est de 7.7 et l'hétérozygotie moyenne par locus est de 0,667. Ces valeurs ont le même ordre de grandeur que celles observées habituellement dans la lignée nord méditerranéenne et supérieures à celles observées dans la lignée Ouest méditerranéenne.

2-2/ Structuration génétique de la population:

Le test exact de l'équilibre de Hardy-Weinberg montre que les 100 colonies échantillonnées en Nouvelle Calédonie ne forment pas une population panmictique ($p = 0.019 < 5\%$). L'analyse des déficits en hétérozygote montre que seuls 3 locus sur les 14 testés présentent un déficit significatif en hétérozygotes (A88, $p < 0,0000$, A 8 $p < 5\%$; Ap55, $P < 1\%$). L'analyse des déséquilibres de liaisons entre paires de locus ne montre que 3 déséquilibres de liaison sur les 91 paires de locus de testées. Aucun des locus ne montre d'excès en hétérozygotes.

Il semble donc que la reproduction soit réalisée de manière assez proche la panmixie et que la population ne présente pas de sous structuration évidente.

L'analyse complémentaire de la structure génétique de la population a permis de déterminer sans *a priori* le nombre de groupes (K) à l'aide du logiciel STRUCTURE (figure 13). Les résultats des classements sont représentés en figure 14.

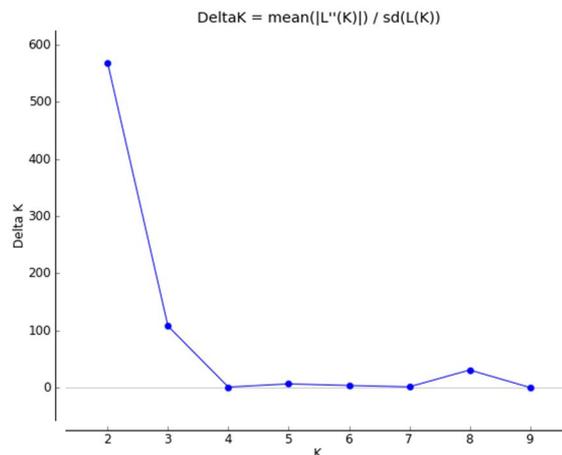


Figure 13 : Calcul de la statistique du ΔK d'après Evanno *et al.* (2005), permettant de définir sans *a priori* le nombre de groupe parmi les échantillons étudiés (Groix et groupes de référence).

Les ΔK obtenus d'après Evanno *et al.* 2005 sont maximums pour $K = 2$ et $K = 3$ (ce qui correspond aux groupes les mieux séparées dans les projections des analyses des ACP (voir plus loin).

Nous avons choisi de représenter les résultats pour $K = 4$ (figure 14) qui correspond au nombre de lignées évolutives classiquement observées chez l'abeille (donc avec *a priori*). Dans cette figure, chaque groupe déterminé est représenté par une couleur. A chaque échantillon (barre verticale) est affecté un pourcentage de classement pour chacun des K groupes (ici 4). En considérant quatre groupes génétiquement homogènes (figure 14), il y a corrélation de ces groupes avec les lignées connues (M, C, A et O) respectivement en rouge, bleu, vert et jaune. Il est à noter que les lignées O et Z forment un groupe génétiquement homogène (jaune). Le résultat obtenu est donc cohérent avec les résultats obtenus avec l'analyse multivariée sur les populations puisque la population de Nouvelle Calédonie apparaissait clairement en position intermédiaire entre les lignées M et C. Dans ce graphique, on observe clairement que tous les individus sont le résultat de classements majoritaires

dans les lignée M et C (rouge et bleu). Il semble également qu'il y ait une légère influence des lignées A et O.

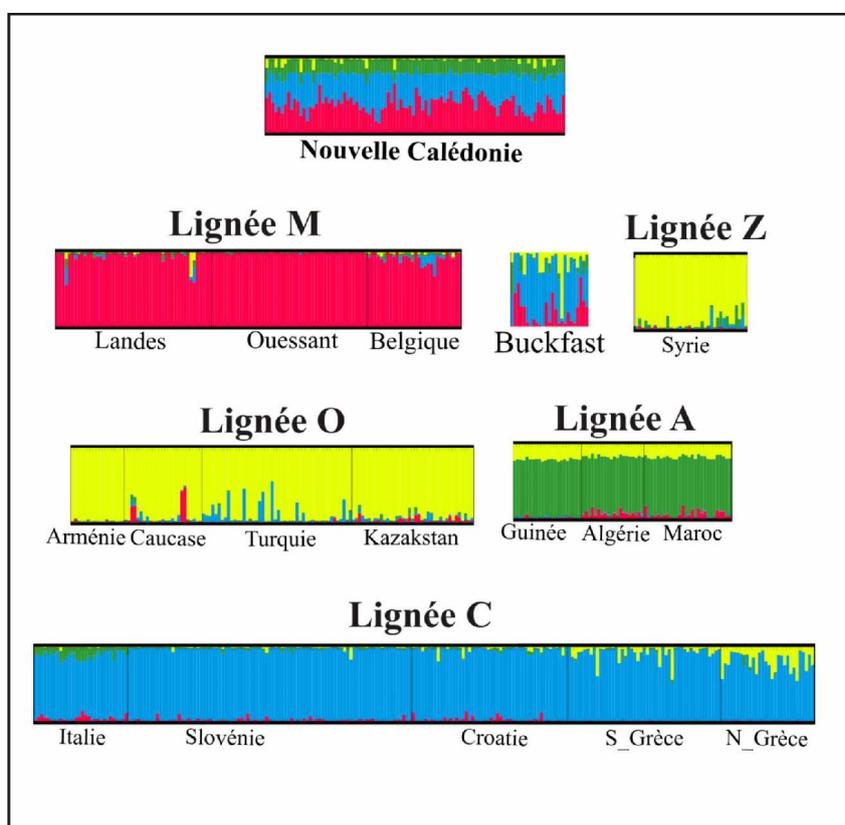


Figure 14 : Représentation des probabilités de classement de chaque individu de la population d'abeilles de Nouvelle Calédonie pour $K = 4$ groupes. Les 4 groupes déterminés par structure correspondent aux lignées M (en rouge), A (en vert), C (en bleu) et O et Z (en jaune). Les abeilles Buckfast de référence apparaissent clairement sous forme d'hybrides entre ces lignées.

Le graphique d'Evanno montrant une légère remontée pour 5 groupes, le graphique pour $K = 5$ est présenté en figure 15. Dans ce graphique, les populations de référence M A, C et O forme des groupes bien différenciés de couleurs respectives rouge, verte, bleue et jaune. La lignée Z est regroupée avec la lignée O. Les échantillons d'abeille de Nouvelle Calédonie forment un groupe supplémentaire qui a sa propre caractéristique génétique (en violet).

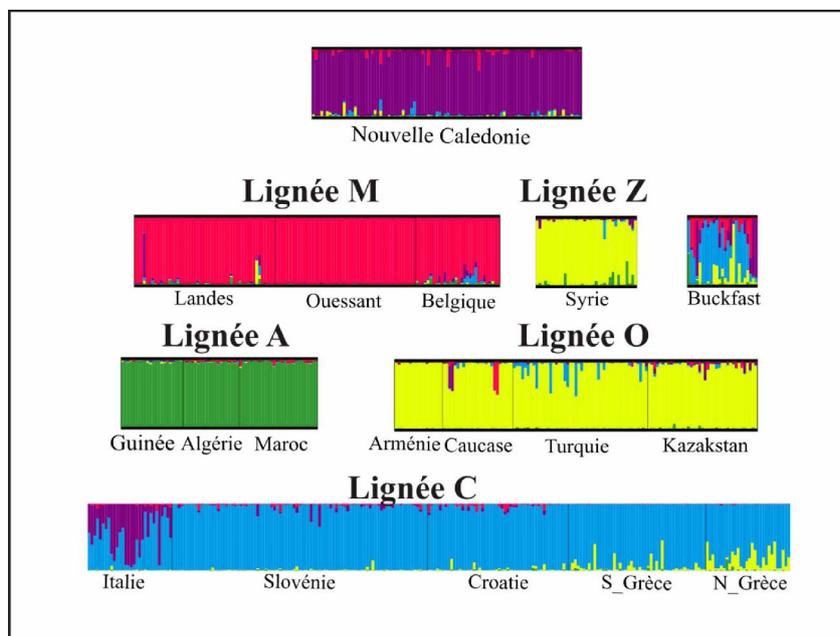


Figure 15 : Représentation des probabilités de classement de chaque individu de la population d'abeilles de Nouvelle Calédonie pour $K = 5$ groupes. Les 5 groupes déterminés par structure correspondent aux lignées M (en rouge), A (en vert), C (en bleu) et O et Z (en jaune). Les abeilles Buckfast de référence apparaissent clairement sous forme d'hybrides entre ces lignées. Le 5ième groupe est représenté par les abeilles de Nouvelle Calédonie (en Violet).

3/ Analyse à l'échelle des individus :

3-1/ Niveaux d'introgression nucléaires et classements des individus :

Le niveau d'introgression correspond à la proportion d'allèles provenant d'autres lignées d'abeilles (C, A ou O). Il correspond au niveau d'hybridation des abeilles avec des souches d'importation. Cette estimation est réalisée en calculant la proportion d'allèles diagnostiques originaires des autres lignées évolutives qui sont présents au niveau du génotype multi-locus de chaque abeille. Le niveau d'introgression peut être estimé à partir de l'ensemble des échantillons de la population, pour chaque rucher et par individu. Dans le premier cas il représente le niveau d'hybridation général de la population.

Dans le cas de la population d'abeilles de Nouvelle Calédonie, compte tenu du fait que nous sommes en dehors de l'aire de répartition naturelle de l'espèce, la population considérée comme locale correspondra à la population d'origine hypothétique, c'est-à-dire l'abeille noire (*A. m. mellifera*) de la lignée Ouest-méditerranéenne. Les pourcentages d'introgression ont été estimés comme étant l'introduction d'allèles de la lignée C dans la lignée M. Ce niveau d'introgression est estimé à 48% pour l'ensemble de la population d'abeilles de Nouvelle Calédonie. Ce qui est très différents de celle de l'ADN mitochondrial qui était de 79%.

Ce pourcentage d'introgression est présenté en détail pour chaque abeille en colonne 2 de l'annexe 4.

3-2/ Test d'assignation à une race géographique

Les tests d'assignation des colonies à une des races de l'aire de répartition naturelle nous permettent de déterminer une probabilité d'appartenance d'un échantillon à l'une de ces races. Dans le cas de populations conservatoires, il est utilisé en parallèle avec les estimations des pourcentages d'introgression et les visualisations des individus sur les figures des analyses en coordonnées principales réalisées sur les individus pour pouvoir trier les colonies

correspondant à des colonies locales de celle qui devront être exclues de la population lorsque l'on désire mettre en place un conservatoire.

Les résultats des tests d'assignation sont présentés en annexe 4 pour chacune des abeilles étudiées. Cette annexe présente les résultats des estimations des niveaux d'introgressions nucléaires (méthode des allèles diagnostiques) ainsi que les probabilités de classement dans une des 13 races représentée dans notre base de données en utilisant la méthode de distance DA de Nei. Ce classement a été réalisé a priori en utilisant les comme populations de de références les 13 races géographiques répertoriées dans notre base de données. Les résultats montrent clairement que les probabilités de classements pour chaque race sont faibles et que le classement de chaque individu se répartit entre 3 races géographiques et une classe d'hybrides représentée par la souche Buckfast. 47 individus se classent au premier rang dans la race *ligustica*, 34 individus dans la classe *mellifera*, 9 dans la classe *carnica* et 10 dans la classe Buckfast. La faiblesse des valeurs de classement et leur hétérogénéité montre clairement que la population est constituée d'hybrides provenant majoritairement des races *ligustica* et *mellifera*.

3-2/ Résultats des ACP inter-individuelles :

Projections selon les axes 1 et 2 de l'analyse :

La matrice d'une Analyse en Coordonnées Principales (ACP) réalisée sur la matrice de distances inter-individuelles présente l'intérêt de définir des nuages de points correspondant à des ensembles d'individus appartenant à une population de référence donnée. Dans la perspective de trier des colonies pour la constitution d'un conservatoire d'abeilles de souche M, il est alors aisé de sélectionner les individus des colonies d'intérêt en ne prenant que ceux compris dans le nuage de points correspondant à la lignée M, et en excluant ceux qui n'étaient pas compris dans ce nuage de points. Dans le cas de populations introgressées, cette représentation de la diversité permet de constater si le nuage de point représentant les individus d'une population forme un ensemble homogène ou hétérogène.

Il est important de noter que ce type d'analyse est réalisé de manière globale en utilisant l'ensemble des échantillons de l'étude (populations de référence et échantillonnage de Nouvelle Calédonie) sans aucun a priori quant à l'appartenance à une lignée ou à une population. Sur les graphiques de projections, les populations de références des lignées M, A, C, O et Z sont représentées par les contours de chacune des populations. Ces contours sont représentés respectivement en rouge, vert, bleu, et jaune.

Chaque abeille collectée en Nouvelle Calédonie est représentée de manière individuelle par une croix noire accompagnée du numéro d'échantillon correspondant. Les projections des individus de Nouvelle Calédonie sont présentées en figure 16.

Les deux premiers axes de l'ACP absorbent 31,7 % de la variance génétique totale ce qui est important dans la représentation de la diversité génétique dans un espace comprenant 799 dimensions. Le premier axe de l'ACP qui représente 25,3% de la variance exprimée, oppose les populations de références C (en bleu), O (en jaune) et Z (en violet) situées à gauche de la figure, aux populations références de la lignée M (situées à droite). Ce premier axe montre très clairement que 25,3 % de la variabilité génétique totale exprimée à l'échelle des individus est lié à une séparation entre les populations de référence M (Dpt40_1992, Dpt64_1992, Belgique, etc...) et les populations de référence C, O et Z (Grèce, Italie, Slovaquie, etc.). Sur ces deux premiers axes, l'ensemble des populations de la lignée M forme un groupe compact. L'échantillon représentant la population de Nouvelle Calédonie forme un groupe homogène situé à égale distance entre les populations de la lignée M et celles de la lignée C. L'échantillon de Nouvelle Calédonie occupe une surface importante du graphique et s'étale depuis les limites des contours des populations de référence de la lignée C (plus particulièrement des populations d'Italie et de Croatie) jusqu'aux limites des populations de la lignée M. Ceci est le reflet d'une part de l'importante variabilité observée pour cette population et d'autre part de l'origine initiale des colonies qui la compose.

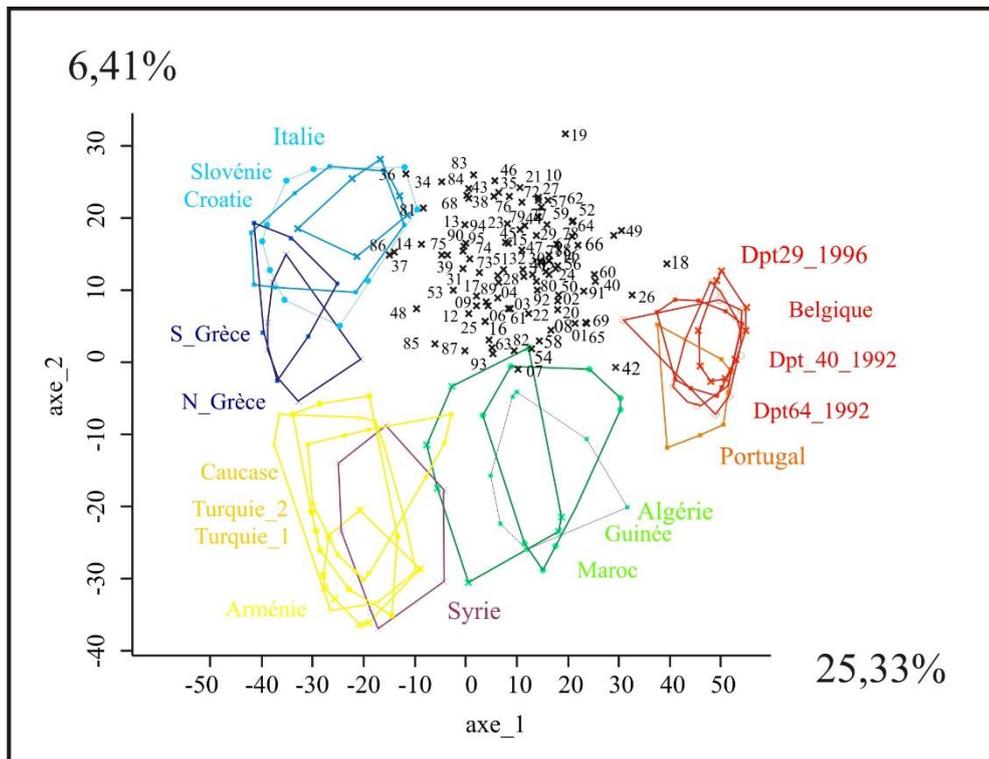


Figure 16 : Projections des individus de Nouvelle Calédonie (croix noirs) sur les deux premiers axes de l'Analyse en Coordonnées Principales (ACP) réalisée avec la matrice des distances inter-individuelles. Seuls les contours des nuages de points, représentant l'ensemble des individus de chaque population de référence, ont été représentés.

Le deuxième axe de l'analyse, exprime 6,4% de la variance totale du système. Les projections des populations selon cet axe opposent clairement les populations africaines (lignée A) et orientales (Lignée O et Z) situées en bas du graphique aux populations des lignées M et C (situées au haut). La position très haute sur le graphique de la population de Nouvelle Calédonie sur cet axe montre clairement qu'il n'y a pas d'influence notable des populations africaines et orientales sur la structure de la population d'abeilles de Nouvelle Calédonie. En effet, aucun individu de la population ne semble se déplacer vers le bas du graphique.

CONCLUSIONS

Si l'on considère que la population d'abeilles de Nouvelle Calédonie était constituée à l'origine d'abeilles noires (*Apis mellifera mellifera*) installées par les frères Maristes, cette population présente un niveau d'introgression mitochondrial important (79%), qui est lié à l'importation de colonies d'abeilles majoritairement de la sous-espèce *Apis mellifera ligustica*. En effet l'haplotype C 2 dont la fréquence est importante en Italie présente une fréquence importante (62%) dans la population d'abeilles de Nouvelle Calédonie. L'analyse des marqueurs microsatellites montre un niveau d'hybridation moyen de la population de 48% par des allèles de la lignée nord méditerranéenne. La différence d'estimation des niveaux d'introgression est probablement à mettre en relation avec la pratique de l'élevage qui a probablement augmenté de manière importante la fréquence des allèles nord méditerranéens dans la population.

Les individus de la population de Nouvelle Calédonie se répartissent dans une zone du graphique de l'analyse en coordonnées principale qui ne correspond à aucune des races de l'aire de répartition naturelle de l'espèce. Leur répartition se trouve située entre les populations de la lignée C et celles de la lignée se qui confirme le caractère hybride de cette population.

La population forme néanmoins un ensemble assez cohérent dont la répartition est circulaire dans le graphique avec une concentration plus importante au centre du nuage de points ce qui est mettre en parallèle avec la position du point de cette population dans l'analyse en coordonnées principales réalisée sur les populations.

Un fonctionnement reproducteur de la population proche du naturel :

L'analyse des paramètres de génétique des populations, montre que l'ensemble des colonies de l'Ile se reproduit en situation proche de la panmixie ce qui vient corroborer l'apparente cohérence de l'ensemble de la population. Il n'y a pas d'évidence d'une sous structuration particulière. La population d'abeilles ne semble donc pas particulièrement perturbée par les pratiques apicoles appliquées sur l'Ile et se comporte pratiquement comme une métapopulation dans laquelle il ne semble pas y avoir de rupture de flux de gènes d'un bout à l'autre de l'Ile. Le faible nombre de déséquilibres de liaisons observé montre également que la structure génétique de la population n'a pas été perturbée de manière significative par des importations récentes qui auraient pu avoir lieu.

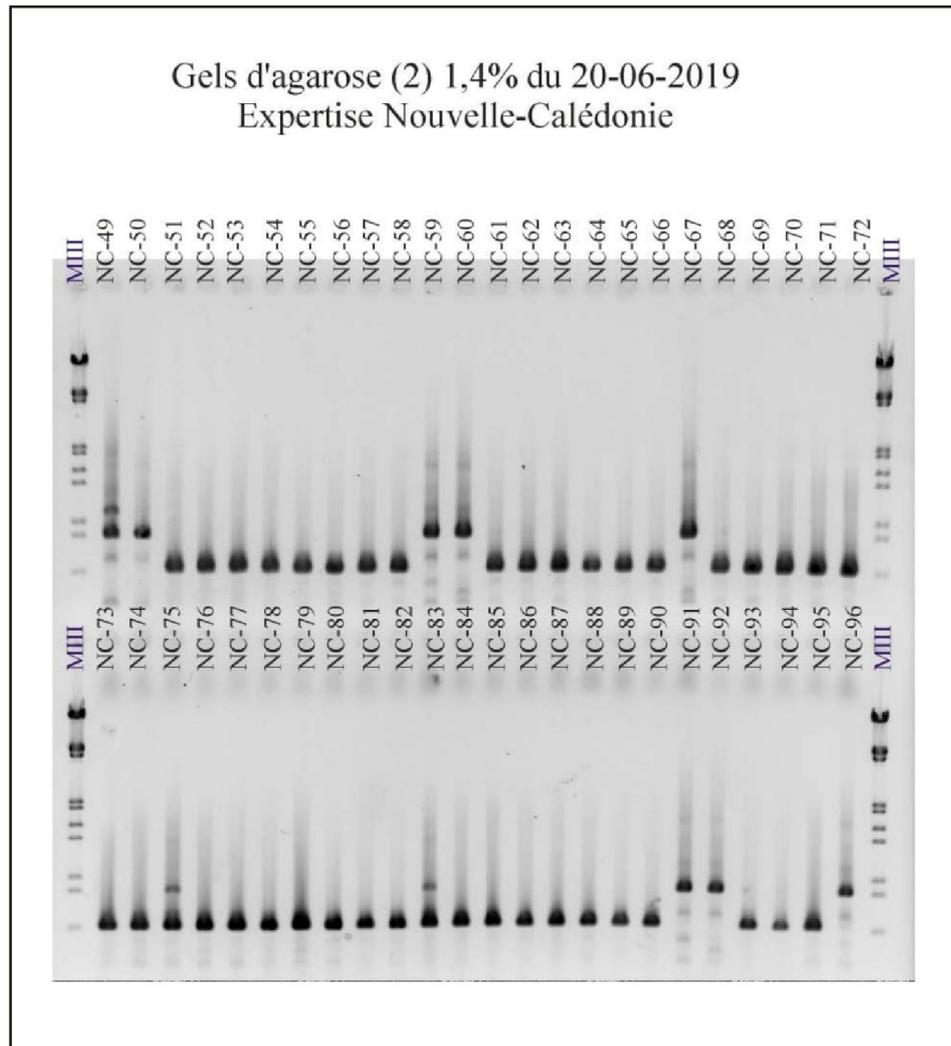
Références bibliographiques

- Alburaki M, Bertrand B, Legout H, Moulin S, Alburaki A, Sheppard WS, Garnery L (2013). A fifth major genetic group among honeybees revealed in Syria. *BMC Genetics*, **14**: 117.
- Cavalli-Sforza L. L., Edwards A. W. F., 1967. Phylogenetic analysis: models and estimation procedures, *Am. J. Hum. Genet.* 19, 233-257.
- Chakraborty R., 1993. Jin L., A unified approach to study hypervariable polymorphism : statistical considerations of determining relatedness and population distances, in Pena S. D. J
- Cornuet *et al.* 1999 : logiciel GENECLASS (version 1.0.02;).
- Cornuet et Piry 2000: logiciel treemaker (version 1.0.1) A windows program for making NJ dendrograms and assigning a bootstrap value between the nodes. Computer software distributed by the authors.
- De la Rúa P., Serrano J., Gallian J., 1998. Mitochondrial DNA variability in the Canary Islands honeybees (*Apis mellifera* L.), *Mol. Ecol.* 7, 1543-1547.
- De la Rúa P., R. Hernandez-Garcia, B.V. Pedersen, J. Gallian J., and J. Serrano (2004) Molecular diversity of the honeybee *Apis mellifera iberica* L. (Hymenoptera: Apidae) from western Andalusia. *Arch. Zootec.* 53: 195-203
- Estoup A., Garnery L., Solignac M., Cornuet J-M., 1995. Microsatellite variation in honey bees (*Apis mellifera*) populations: hierarchical genetic structure and test of infinite and stepwise mutation models. *Genetics* 140, 679-695.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol Ecol* **14**: 2611-2620.
- Franck P, L. Garnery, M. Solignac and J.-M. Cornuet, 1998. The origin of West European subspecies of honeybees (*Apis mellifera*): new insights from microsatellite and mitochondrial data. *Evolution* 52, 1119-1134.
- Franck P, L. Garnery, G. Celebrano, M. Solignac, J.M. Cornuet, 2000. Hybrid origins of the Italian honey bee (*Apis mellifera ligustica* and *A. m. sicula*). *Mol. Ecol.* 9, 907-921.
- Franck P, L. Garnery, A. Loiseau, B.P. Oldroyd, H.R. Hepburn, M. Solignac and J.-M. Cornuet (2001) Genetic diversity of the honeybee in Africa: microsatellite and mitochondrial data. *Heredity* 86: 420-430
- Garnery L., J.M. Cornuet, and M. Solignac, 1992. Evolutionary history of the honeybee (*Apis mellifera* L.) inferred from mitochondrial DNA analysis. *Mol. Ecol.* 3, 145-154.
- Garnery L., M. Solignac, G. Celebrano, and J.M. Cornuet, 1993. A simple test using restricted PCR-amplified mitochondrial DNA to study the genetic structure of *Apis mellifera* L.: *Experientia* 49:1016-1021.
- Garnery L., E.H. Mosshine and J.M. Cornuet, 1995. Mitochondrial DNA variation in Moroccan and Spanish honey bee populations. *Mol. Ecol.* 4:465-471.
- Garnery L., P. Franck, E. Baudry, D. Vautrin, J.M. Cornuet, et M. Solignac, (1998a) Genetic biodiversity of the West european honey bee (*Apis mellifera mellifera* and *A. m. iberica*) I: Mitochondrial DNA. *Gen. Sel. Evol.* 30 (1): 31-47.
- Garnery L., P. Franck, E. Baudry, D. Vautrin, J.M. Cornuet, et M. Solignac, (1998b) Genetic biodiversity of the West european honey bee (*Apis mellifera mellifera* and *A. m. iberica*) II: Microsatellite loci. *Gen. Sel. Evol.* 30 (1): 49-74.
- Goetze G., 1964. Die Honigbiene in natürlicher und künstlicher Zucht, Parey, Hamburg

- Langella, 1999 logiciel POPULATIONS (version 1.2.21).
- Langella, 2001 logiciel TREEPLOT (version 0.6) .
- Langella 2001 programme NEEES (version 0.8).
- Nei M., 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals, *Genetics* 47, 253-259.
- Nei M., Tajima F., 1981. DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases, *Genetics* 97, 145-163.
- Paetkau D., Calvert W., Stirling I., Strobeck C., 1995. Microsatellite analysis of population structure in canadian polar bear., *Mol. Ecol.* 4, 347-354.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**: 945-959.
- Raymond M., Rousset F., 1995. Genepop (Version 1.2) : population genetics software for exact test and ecumenism, *J. Hered.* 86, 248-250.
- Rosenberg NA (2004). DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. *MolEcol Notes* **4**: 137-138
- Ruttner F., Tassencourt L., Louveaux J., Biometrical-statistical analysis of the geographic variability of *Apis mellifera* L. *Apidologie* 9 (1978): 363-381
- Ruttner F., 1988. Biogeography and taxonomy of honey bees, Springer-Verlag, Berlin, pp 284
- Saitou N., Nei M., 1987. The neighbor-joining method : a new method for reconstructing phylogenetic trees, *Mol. Biol. Evol.* 4, 406-425.
- Takezaki N, Nei M., 1996. Genetic distances and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA, *Genetics* 144, 389-399.
- Walsh P.S., D.A. Metzger, R. Higushi (1991) Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR based typing from forensic material. *Biotechniques* 10: 506-513

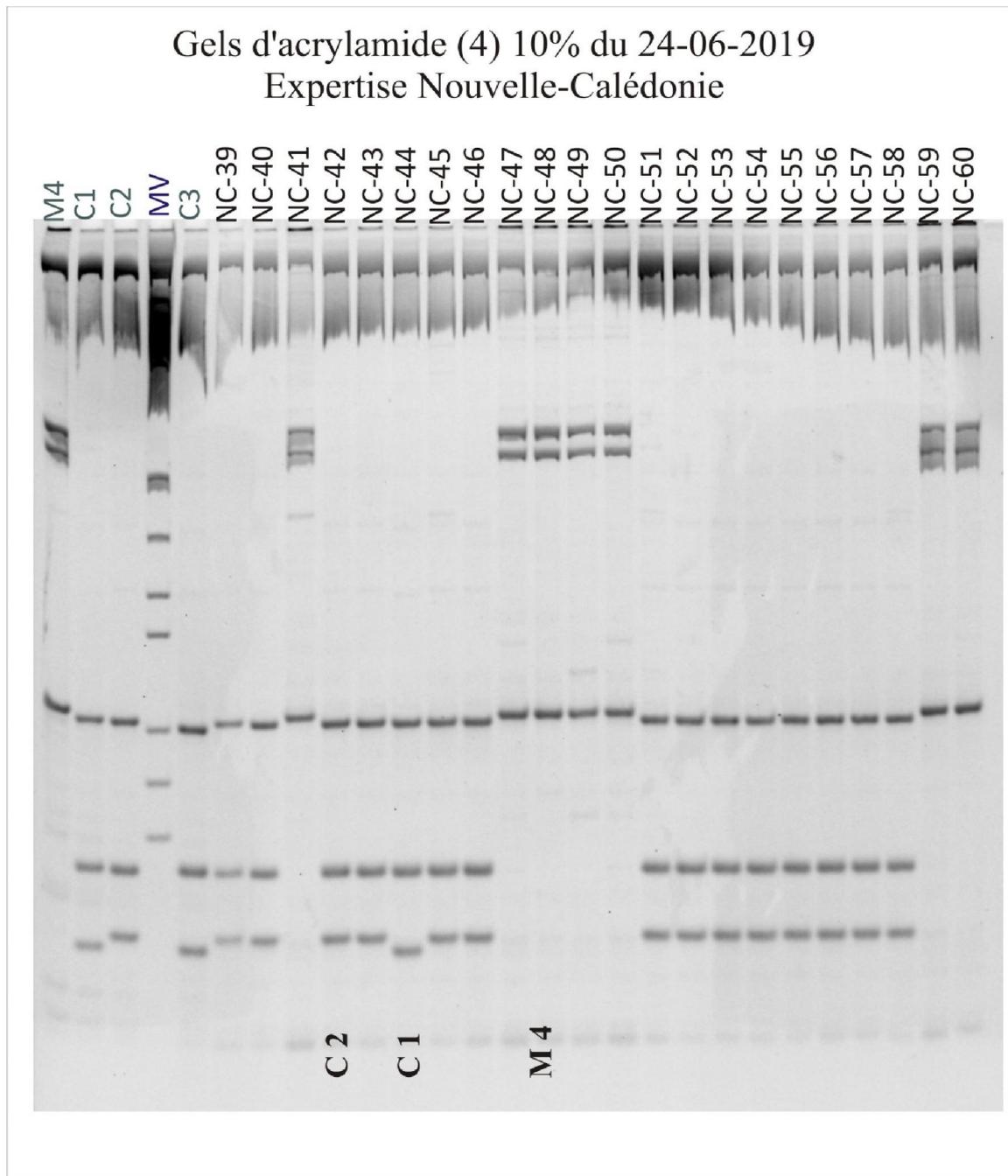
ANNEXES

Annexe 1



Annexe 1 : Exemple de profil de migration en gel d'agarose des produits d'amplification de la région intergénique COI-COII. Chaque gel comporte un marqueur de taille (MarqIII). Chaque individu correspond à un puits de dépôt (ligne verticale). On distingue sur les gels 2 tailles différentes de produits d'amplification. Le type ultra-court de structure Q (*ie* : N_51, NC_61, NC_68, NC_73 et NC_93). Des fragments moyens de structure PQQ (NC_49, NC_59, NC_67 et NC_91).

Annexe 2



Annexe 2 : Exemple de profils de migration en gels poly-acrylamide des produits d'amplification de la région intergénique COI-COII après digestion par l'enzyme *Dra* I. Chaque gel comporte un marqueur de taille (Marq V) et des témoins dont le profil est connu M4 et C1 ou C 2. Des haplotypes différents sont indiqués sur les gels (ie C1, C 2 et M 4).

Annexe 3

Résultats totaux obtenus avec le test mitochondrial pour chacun des individus de l'étude. La première colonne correspond au numéro de l'échantillon. La seconde colonne indique la structure de la région intergénique et la troisième colonne la lignée et le n° d'haplotype de l'échantillon.

Individu	Long	Haplot	Individu	Long	Haplot	Individu	Long	Haplot
NC_01	Q	C 2	NC_35	Q	C 2	NC_68	Q	C 2
NC_02	Q	C 2	NC_36	Q	C 2	NC_69	Q	C 2
NC_03	Q	C 1	NC_37	Q	C 2	NC_70	Q	C 2
NC_04	Q	C 2	NC_38	Q	C 2	NC_71	Q	C 2
NC_05	Q	C 2	NC_39	Q	C 2	NC_72	Q	C 2
NC_06	Q	C 2	NC_40	Q	C 2	NC_73	Q	C 1
NC_07	Q	C 2	NC_41	PQQ	M 4	NC_74	Q	C 1
NC_08	Q	C 1	NC_42	Q	C 2	NC_75	Q	C 2
NC_09	Q	C 2	NC_43	Q	C 2	NC_76	Q	C 2
NC_10	Q	C 2	NC_44	Q	C 1	NC_77	Q	C 2
NC_11	Q	C 2	NC_45	Q	C 2	NC_78	Q	C 2
NC_12	Q	C 2	NC_46	Q	C 2	NC_79	Q	C 2
NC_13	Q	C 1	NC_47	PQQ	M 4	NC_80	Q	C 2
NC_14	Q	C 1	NC_48	PQQ	M 4	NC_81	Q	C 2
NC_15	Q	C 2	NC_49	PQQ	M 4	NC_82	Q	C 2
NC_16	Q	C 2	NC_50	PQQ	M 4	NC_83	Q	C 2
NC_17	PQQ	M 4	NC_51	Q	C 2	NC_84	Q	C 2
NC_18	PQQ	M 4	NC_52	Q	C 2	NC_85	Q	C 2
NC_19	Q	C 1	NC_53	Q	C 2	NC_86	Q	C 2
NC_20	Q	C 1	NC_54	Q	C 2	NC_87	Q	C 2
NC_21	PQQ	M 4	NC_55	Q	C 2	NC_88	Q	C 2
NC_22	PQQ	M 4	NC_56	Q	C 2	NC_89	Q	C 2
NC_23	Q	C 2	NC_57	Q	C 2	NC_90	Q	C 2
NC_24	Q	C 2	NC_58	Q	C 2	NC_91	PQQ	M 4
NC_25	Q	C 2	NC_59	PQQ	M 4	NC_92	PQQ	M 4
NC_26	PQQ	M 4	NC_60	PQQ	M 4	NC_93	Q	C 2
NC_27	PQQ	M 4	NC_61	Q	C 2	NC_94	Q	C 2
NC_28	PQQ	M 4	NC_62	Q	C 2	NC_95	Q	C 2
NC_29	Q	C 1	NC_63	Q	C 2	NC_96	PQQ	M 4
NC_30	PQQ	M 4	NC_64	Q	C 2	NC_97	PQQ	C 2
NC_31	PQQ	M 7	NC_65	Q	C 2	NC_98	PQQ	M 4
NC_32	Q	C 2	NC_66	Q	C 2	NC_99	PQQ	C 2
NC_33	Q	C 2	NC_67	PQQ	M 4	NC_100	PQQ	C 2
NC_34	Q	C 1						

Annexe 4

Annexe 4 : Résultats des différentes méthodes d'estimations des introgressions à partir des données microsatellites. En première colonne est indiqué le n° de l'échantillon. La seconde colonne correspond au pourcentage d'introgression (hybridation) estimé par la méthode des allèles diagnostiques. Les colonnes 3 à 10 correspondent aux probabilités d'appartenance de chaque individu à une race géographique selon la méthode DA de Nei. Pour ce test, les deux premières colonnes indiquent respectivement le classement de rang 1 et sa probabilité de classement et les deux suivantes le classement de second rang et ainsi de suite.

	Introg	rang	score	rang	score	rang	score	rang	score
Individu	%C	1	%	2	%	3	%	4	%
NC_01	0,41	mellifera	10,51	ligustica	8,36	Buckfast	8,09	carnica	8,03
NC_02	0,27	mellifera	11,53	Buckfast	9,43	ligustica	9,41	carnica	8,26
NC_03	0,46	ligustica	9,72	carnica	8,95	Buckfast	8,87	mellifera	8,25
NC_04	0,50	ligustica	9,79	carnica	9,27	Buckfast	8,46	Caucasica	8,02
NC_05	0,40	ligustica	11,47	mellifera	8,95	carnica	8,95	Buckfast	8,80
NC_06	0,59	ligustica	9,85	Buckfast	8,91	carnica	8,80	cecropia	8,20
NC_07	0,50	Buckfast	9,07	mellifera	8,84	ligustica	8,76	macedonica	8,01
NC_08	0,42	mellifera	9,77	Buckfast	9,41	carnica	8,14	intermissa	8,13
NC_09	0,63	carnica	9,40	macedonica	8,95	ligustica	8,83	cecropia	8,69
NC_10	0,46	ligustica	10,76	Buckfast	10,12	mellifera	9,48	carnica	9,13
NC_11	0,42	mellifera	10,11	Buckfast	9,36	carnica	8,82	ligustica	8,50
NC_12	0,63	Buckfast	9,49	carnica	9,12	ligustica	8,42	Caucasica	8,37
NC_13	0,63	ligustica	10,07	Buckfast	10,07	carnica	9,21	macedonica	8,97
NC_14	0,63	ligustica	12,12	carnica	10,73	Buckfast	9,42	cecropia	8,99
NC_15	0,50	Buckfast	9,90	ligustica	9,43	carnica	8,87	mellifera	8,69
NC_16	0,55	ligustica	9,04	carnica	8,54	Buckfast	8,51	mellifera	8,02
NC_17	0,54	ligustica	10,12	Buckfast	9,87	carnica	8,99	mellifera	8,17
NC_18	0,21	mellifera	12,81	ligustica	8,89	Buckfast	8,39	intermissa	8,27
NC_19	0,42	ligustica	10,33	mellifera	9,93	carnica	9,42	Buckfast	8,53
NC_20	0,42	mellifera	10,22	ligustica	9,32	Buckfast	9,27	carnica	8,17
NC_21	0,41	ligustica	11,25	carnica	9,70	mellifera	9,07	Buckfast	9,04
NC_22	0,42	mellifera	9,75	Buckfast	9,47	carnica	8,55	ligustica	8,54
NC_23	0,50	ligustica	10,15	carnica	9,23	mellifera	8,66	Buckfast	8,39
NC_24	0,42	mellifera	10,18	ligustica	9,16	carnica	8,87	Buckfast	8,29
NC_25	0,50	carnica	9,03	Buckfast	9,00	ligustica	8,99	cecropia	8,81
NC_26	0,29	mellifera	12,46	Buckfast	8,55	ligustica	8,40	intermissa	8,09
NC_27	0,42	ligustica	10,56	mellifera	10,08	Buckfast	9,50	carnica	9,35
NC_28	0,46	ligustica	9,52	Buckfast	9,27	mellifera	9,01	carnica	8,69
NC_29	0,38	ligustica	11,22	mellifera	9,71	Buckfast	9,19	carnica	9,10
NC_30	0,46	mellifera	9,36	ligustica	9,22	Buckfast	8,79	carnica	8,54

	Introg	rang	score	rang	score	rang	score	rang	score
Individu	%C	1	%	2	%	3	%	4	%
NC_31	0,50	ligustica	10,53	carnica	9,64	Buckfast	9,16	cecropia	8,40
NC_32	0,58	ligustica	9,47	carnica	9,27	Caucasica	8,92	Buckfast	8,64
NC_33	0,58	ligustica	9,45	carnica	9,02	Buckfast	9,02	Syriaca	8,23
NC_34	0,63	ligustica	11,81	carnica	10,92	cecropia	9,06	Buckfast	9,01
NC_35	0,63	carnica	9,56	ligustica	9,35	Buckfast	9,32	mellifera	8,45
NC_36	0,71	ligustica	12,11	carnica	12,09	cecropia	10,29	macedonica	9,27
NC_37	0,71	carnica	11,61	ligustica	11,18	Buckfast	10,12	cecropia	9,65
NC_38	0,58	ligustica	9,83	Buckfast	9,76	carnica	9,65	mellifera	8,29
NC_39	0,54	ligustica	10,11	carnica	9,58	Buckfast	9,54	cecropia	8,54
NC_40	0,27	mellifera	12,24	ligustica	8,81	Buckfast	8,80	carnica	8,44
NC_41	0,46	ligustica	10,11	Buckfast	9,02	carnica	8,71	mellifera	8,59
NC_42	0,33	mellifera	12,25	Buckfast	8,69	intermissa	8,28	major	7,96
NC_43	0,58	carnica	11,33	ligustica	11,32	Buckfast	9,81	cecropia	8,56
NC_44	0,46	mellifera	10,20	Buckfast	10,04	ligustica	9,29	carnica	9,21
NC_45	0,46	Buckfast	9,73	carnica	9,57	ligustica	9,00	mellifera	8,54
NC_46	0,54	carnica	11,35	ligustica	10,59	Buckfast	9,44	mellifera	8,55
NC_47	0,50	ligustica	10,02	Buckfast	9,30	mellifera	9,08	carnica	8,96
NC_48	0,67	ligustica	10,10	carnica	9,57	Buckfast	8,60	cecropia	8,36
NC_49	0,25	mellifera	14,66	Buckfast	9,70	carnica	8,39	ligustica	8,26
NC_50	0,38	mellifera	10,08	ligustica	8,80	carnica	8,73	Buckfast	8,60
NC_51	0,54	ligustica	11,82	Buckfast	9,71	carnica	8,85	Caucasica	8,03
NC_52	0,38	mellifera	10,14	Buckfast	9,46	ligustica	9,10	carnica	8,73
NC_53	0,64	ligustica	10,59	Buckfast	10,06	carnica	9,63	cecropia	8,78
NC_54	0,42	mellifera	9,34	Buckfast	8,73	ligustica	8,59	carnica	7,99
NC_55	0,38	mellifera	10,35	ligustica	9,45	Buckfast	9,09	carnica	9,08
NC_56	0,38	mellifera	9,95	ligustica	9,51	carnica	8,97	Buckfast	8,72
NC_57	0,50	ligustica	10,47	mellifera	9,80	Buckfast	9,23	carnica	8,49
NC_58	0,46	ligustica	9,61	mellifera	9,20	Buckfast	9,15	carnica	8,38
NC_59	0,42	mellifera	11,09	ligustica	10,10	carnica	9,15	Buckfast	8,91
NC_60	0,33	mellifera	11,80	Buckfast	8,95	ligustica	8,59	carnica	8,28
NC_61	0,50	Buckfast	9,88	carnica	8,97	mellifera	8,62	ligustica	8,31
NC_62	0,38	ligustica	11,09	mellifera	10,17	carnica	9,58	Buckfast	9,30
NC_63	0,50	Buckfast	9,18	ligustica	8,87	carnica	8,45	mellifera	8,40
NC_64	0,29	mellifera	11,16	ligustica	9,51	carnica	8,26	Buckfast	8,25
NC_65	0,29	mellifera	11,43	Buckfast	8,86	carnica	8,03	intermissa	7,83
NC_66	0,33	mellifera	11,38	Buckfast	9,85	ligustica	9,84	carnica	8,48
NC_67	0,38	mellifera	10,82	Buckfast	10,46	ligustica	9,55	carnica	9,14
NC_68	0,58	carnica	10,69	ligustica	9,75	macedonica	8,93	cecropia	8,81
NC_69	0,33	mellifera	11,38	Buckfast	9,20	ligustica	8,61	carnica	8,18

	Introg	rang	score	rang	score	rang	score	rang	score
Individu	%C	1	%	2	%	3	%	4	%
NC_70	0,33	mellifera	12,61	Buckfast	9,09	ligustica	8,61	carnica	8,11
NC_71	0,42	ligustica	9,18	mellifera	9,00	carnica	8,47	Buckfast	8,30
NC_72	0,42	ligustica	9,54	mellifera	9,40	carnica	9,11	Buckfast	8,93
NC_73	0,58	ligustica	9,65	Buckfast	9,20	carnica	8,84	Caucasica	8,25
NC_74	0,58	ligustica	10,25	carnica	9,15	Buckfast	8,70	macedonica	8,22
NC_75	0,63	ligustica	11,21	carnica	10,54	Buckfast	9,30	cecropia	8,49
NC_76	0,54	ligustica	10,58	carnica	9,63	Buckfast	9,22	mellifera	8,99
NC_77	0,50	ligustica	9,90	mellifera	9,15	Buckfast	9,09	carnica	9,08
NC_78	0,42	mellifera	10,63	Buckfast	10,10	ligustica	9,42	carnica	8,79
NC_79	0,46	carnica	10,14	ligustica	9,75	mellifera	9,73	Buckfast	9,65
NC_80	0,38	mellifera	9,90	ligustica	9,80	Buckfast	8,65	carnica	8,58
NC_81	0,71	carnica	10,87	ligustica	10,39	Buckfast	9,85	cecropia	9,73
NC_82	0,46	Buckfast	9,62	ligustica	9,27	mellifera	8,45	carnica	8,45
NC_83	0,54	ligustica	13,42	carnica	10,54	Buckfast	9,52	cecropia	8,30
NC_84	0,54	ligustica	11,05	carnica	9,86	cecropia	8,56	Buckfast	8,47
NC_85	0,71	ligustica	9,33	carnica	9,08	Caucasica	8,92	macedonica	8,76
NC_86	0,75	ligustica	12,56	carnica	10,17	cecropia	9,02	macedonica	8,46
NC_87	0,58	Buckfast	9,64	ligustica	8,95	carnica	8,34	anatoliaca	8,19
NC_88	0,42	ligustica	10,26	mellifera	9,72	Buckfast	8,97	carnica	8,63
NC_89	0,54	Buckfast	10,17	ligustica	9,51	carnica	8,93	mellifera	8,15
NC_90	0,63	ligustica	10,24	carnica	9,22	Buckfast	8,43	macedonica	8,07
NC_91	0,41	mellifera	10,55	intermissa	8,77	Buckfast	8,77	ligustica	8,74
NC_92	0,42	mellifera	9,86	ligustica	9,64	carnica	8,79	Buckfast	8,73
NC_93	0,58	Buckfast	9,10	ligustica	8,77	carnica	8,51	Caucasica	8,34
NC_94	0,54	ligustica	11,17	carnica	9,85	Buckfast	8,62	cecropia	7,95
NC_95	0,63	ligustica	10,75	carnica	10,00	Buckfast	9,60	cecropia	8,67
NC_96	0,33	mellifera	10,57	Buckfast	8,96	carnica	8,96	ligustica	8,40
NC_97	0,21	mellifera	13,69	Buckfast	8,65	ligustica	8,60	intermissa	7,84
NC_98	0,58	ligustica	10,17	Buckfast	9,43	carnica	8,96	mellifera	8,80
NC_99	0,58	ligustica	11,54	carnica	10,55	Buckfast	9,35	cecropia	8,24
NC_100	0,29	mellifera	11,86	intermissa	9,02	Buckfast	8,36	major	8,24