



Rapport d'expertise 2018
Analyses génétiques de la population d'abeilles mellifères
de l'Ile de Groix
Département du Morbihan



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).

Ce sont les importations par l'homme qui ont ensuite conduit à sa présence, puis à sa dispersion, en Amérique et en Océanie.

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).

- 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 multi-hybride sélectionnée Buckfast (au Nord-Est).

En France, comme ailleurs, 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 l'écotype landais de l'abeille noire.

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'association Asan.Gx, est un exemple de ces associations et est l'une des structures fondatrices de la Fédération Européenne des Conservatoires d'Abeilles Noires (FEEdCAN) créée en 2015.

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 observé. Cette étude sert donc de support scientifique à la création et au maintien de conservatoires génétiques d'abeilles.

Le projet de collaboration engagé entre l'association Asan.Gx 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 l'île de Groix. Il s'agira de (i) déterminer l'impact des pratiques humaines sur la structuration de la diversité de la population, (ii) déterminer si ces populations sont encore suffisamment pures pour envisager la mise en place de conservatoire d'abeilles *Apis mellifera mellifera* (iii) mettre en place un protocole de gestion de la diversité de cette population conservatoire.

La caractérisation de la structure génétique de cette population permettra d'estimer les paramètres de la conservation (estimateurs du niveau de variabilité naturelle de la population) et de caractériser le niveau d'introgession nucléaire et mitochondriale de la population d'abeille. La connaissance de cette diversité permettra de mettre en place un protocole de gestion de la diversité génétique de cette population conservatoire, qui à terme pourra servir de réservoir de gènes d'origine locale, dans des programmes de sélection et de relance de l'utilisation de la souche locale d'abeille.

Ce territoire fait partie de l'aire de répartition naturelle de l'abeille domestique *Apis mellifera* L., et est naturellement occupé par la sous espèce *A.mellifera mellifera* appartenant à la lignée évolutive Ouest méditerranéenne (lignée M).

Notre équipe apportera ainsi une expertise qui permettra à l'association de conservation de l'abeille noire de l'île de Groix, de mettre en place un programme de gestion de la diversité de cette population afin de maintenir la diversité locale, en limitant les risques d'introgession liés à l'importation de reines ou à la transhumance de ruches et ainsi de mieux gérer le cahier des charges de ce conservatoire.

Principe de l'étude :

Quand une association apicole régionale souhaite mettre en place un conservatoire d'abeilles, elle doit, d'une part, choisir la meilleure zone pour installer les colonies et d'autre part sélectionner les colonies à conserver.

Les apiculteurs réalisent donc des prélèvements d'abeilles dans plusieurs dizaines de colonies et les envoient à notre laboratoire pour analyses. Les analyses de l'ADN de ces abeilles que nous réalisons nous permettent de désigner les colonies qui ne sont pas, ou sont seulement peu, introgressées par des allèles en provenance des lignées C, O et A. Par ailleurs, si le choix de l'implantation du conservatoire n'a pas encore été fait par l'association, nos résultats permettent également de proposer d'installer le conservatoire dans la zone géographique où se trouve le plus faible niveau d'introggression.

1/ Principe de l'échantillonnage

Afin de pouvoir analyser les résultats à l'échelle de la population, les ruchers échantillonnés doivent couvrir une zone comprise entre 7 et 15 kilomètres de rayon, dans laquelle sont prélevées 350 abeilles. Une abeille est prélevée par colonie, et l'échantillonnage est réalisé soit systématiquement ou bien de manière proportionnelle au nombre de colonies présentes chez les différents apiculteurs (si la densité de colonies dépasse l'effectif de l'échantillonnage). 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. Dans le cas particulier des îles, les prélèvements sont réalisés en adaptant la méthode d'échantillonnage à la surface et à la topographie du site.

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 (13 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'introggression à l'échelle de la population. L'analyse de l'ADN nucléaire nous permet de déterminer les niveaux d'hybridation dans la population et, par là même, de sélectionner des colonies faiblement hybridées 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'introggression de la population doit être réalisé avec les deux types de marqueurs. Dans ce dernier cas l'appartenance de la colonie à la race *mellifera* 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 l'île de Groix.

L'ADN mitochondrial :

Un exemple d'études d'impacts réalisées entre 2004 et 2006 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 était déjà très hétérogène en France.

Les abeilles ayant une origine maternelle appartenant à la race *mellifera* (lignée évolutive M) restaient 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 de l'Europe ces dix dernières années, les niveaux d'importation évoluent rapidement dans certaines populations françaises et risquent de conduire à la disparition de l'abeille endémique, ce qui montre l'urgence de la mise en place des conservatoires génétique.

En dehors des zones de frontières, la lignée M est la lignée qui est naturellement présente en France. 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).

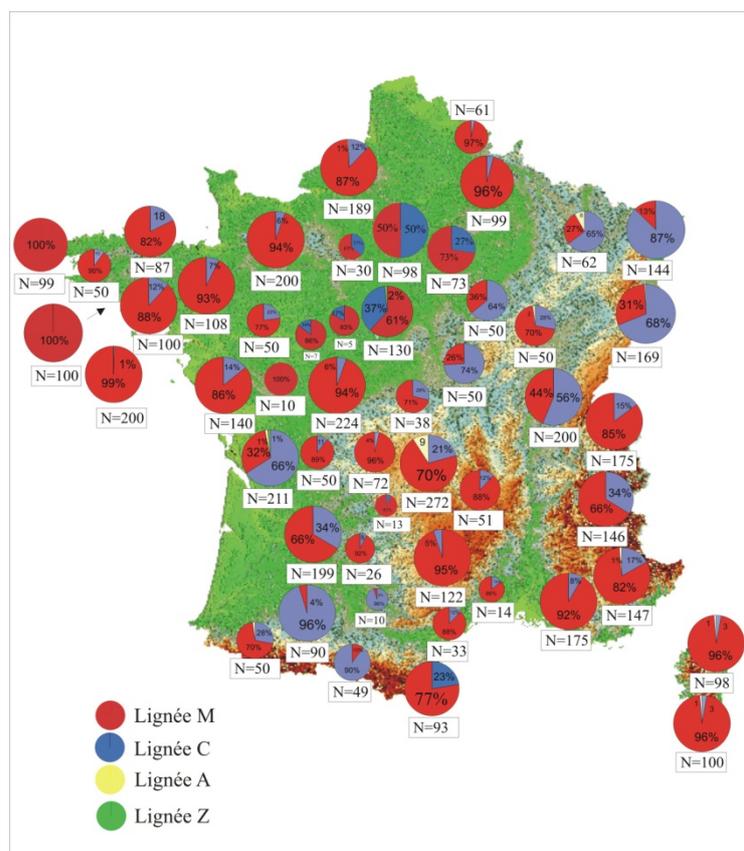


Figure 1 : Proportions des différentes lignées mitochondriales dans les régions françaises (lignée M, en rouge, lignées C et O en bleu, lignée A en jaune). Le nombre d'abeilles analysées est indiqué sous chaque camembert. Bilan du cheptel Français de l'abeille domestique (2004- 2006).

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 de l'île de Groix

L'échantillonnage de la population d'abeille de l'île de Groix a été réalisé par les apiculteurs de l'AsanGX. L'ensemble des colonies répertoriées a été prélevé que cela soit chez les membres de l'Association AsanGX, chez les non membres ainsi que sur les colonies vivant à l'état sauvage identifiées dans différentes cavités de l'île (figure 2). Une abeille par colonie, pour l'ensemble des colonies cartographiées, a été prélevée et conservée 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 208 colonies. 187 d'entre elles sont des colonies gérées et 21 sont des colonies « sauvages ».

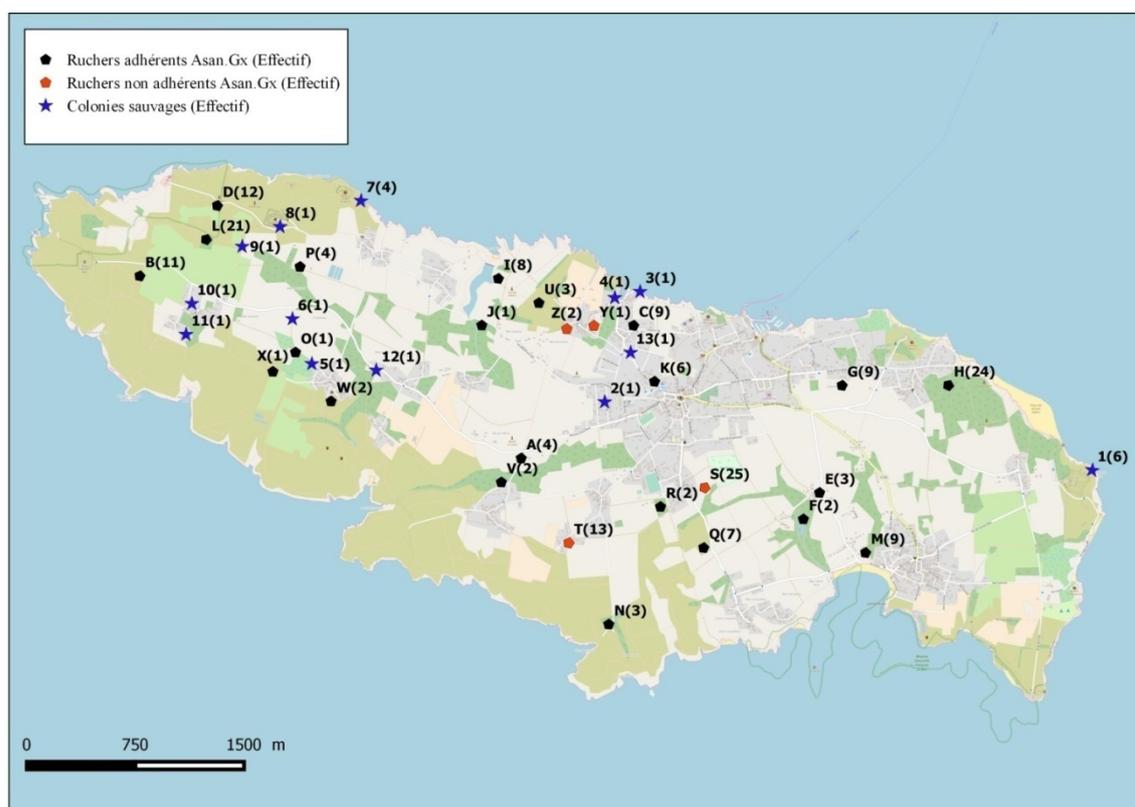


Figure 2 : Carte d'échantillonnage des colonies de l'île de Groix. Les pentagones représentent des ruchés gérés. Les étoiles bleues représentent des colonies sauvages. Les pentagones noirs sont des ruchers adhérents à l'association Asan.Gx. Les pentagones rouges sont des ruchers non adhérents à l'association à la date d'échantillonnage. Les ruchers gérés sont indiqués par une lettre et les colonies sauvages par un chiffre. Le nombre de colonies pour chaque site est indiqué entre parenthèses.

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 Groix ont été comparés à différentes populations de notre base de données. Ainsi, 20 populations appartenant à 13 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 (40_1992) : *A.m.mellifera*, Sud-ouest France (Sabres), n = 45 abeilles
- Ouessant (1996) : *A.m.mellifera*, Conservatoire d'Ouessant, n = 50 abeilles
- Nord (59_1992) : *A.m.mellifera*, Nord (Valenciennes), n = 54 abeilles
- Ouessant_2005 (29_2005), *A.m. mellifera*, n = 100 abeilles
- Pyrénées Atlantiques (64_1992), *A.m. mellifera*, n = 39 abeilles
- Belle_Ile (2006), *A.m.mellifera*, n = 200 abeilles

Lignée C (Nord-méditerranéenne)

- Italie (1993), *A.m.ligustica*, Italie (Forli), n=30 abeilles
- Croatie (1998), *A.m.carnica*, n = 50 abeilles
- Slovénie (2005), *A.m.carnica*, n = 91 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
- Bulgarie (1994), *A.m.carnica*, n= 25 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

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, n = 96 abeilles

Lignée synthétique Buckfast, n = 25 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 15minutes. 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.

Afin de distinguer les lignées M et A (dont la différence de taille P/P_0 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*

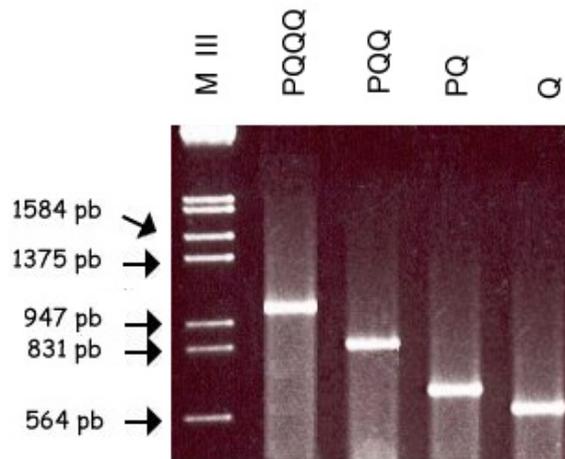


figure 3 : Profils de migrations sur gel d'agarose correspondant aux différentes longueurs de la région intergénique COI-COII.

- 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).

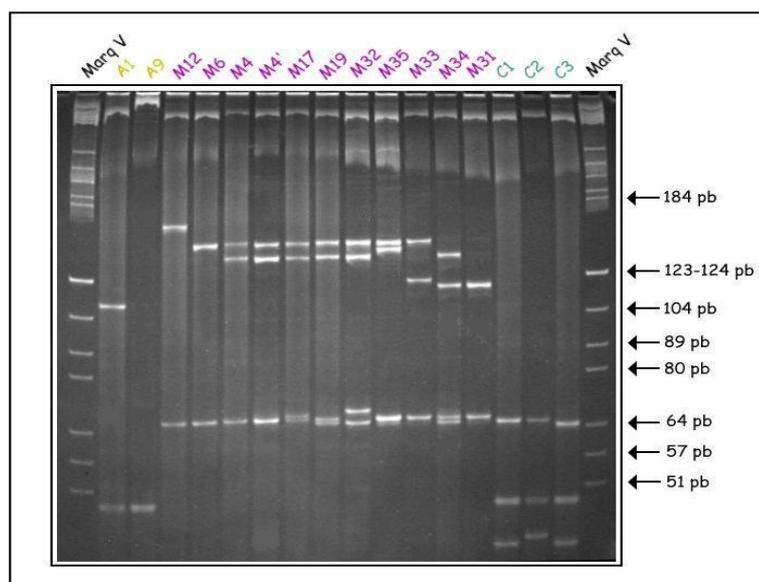


Figure 4: Exemple de profils de restriction de la région COI-COII après digestion par l'enzyme *DraI* (les lettres correspondent aux lignées évolutives, suivi du numéro d'haplotype dans la lignée). Les haplotypes sont codés en fonction de leur appartenance à une lignée et comportent chacun un numéro 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.

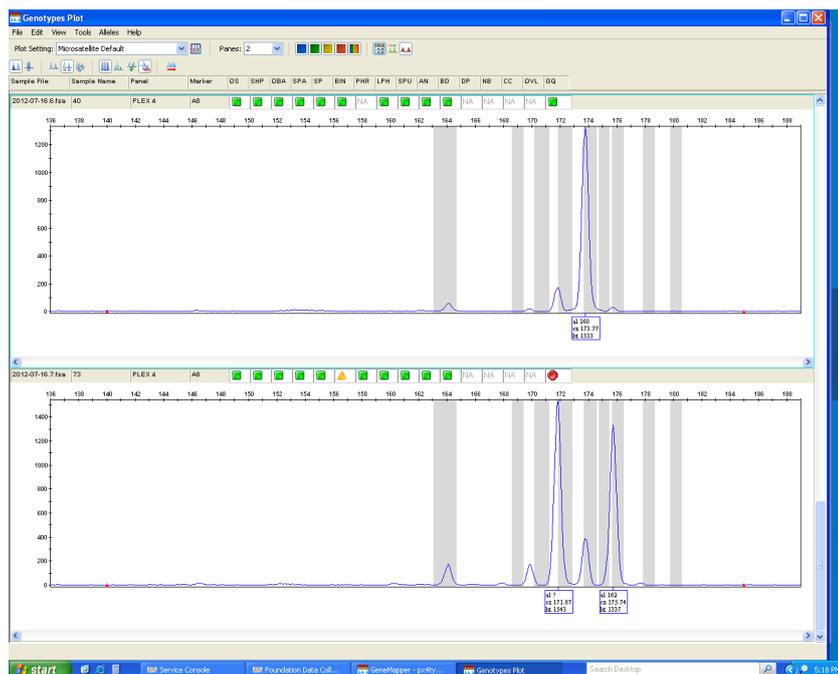


Figure 5 : Exemples de profils de migration au séquenceur automatique de deux ouvrières génotypées au locus A8. Le premier individu est homozygote pour l'allèle 160 et le second, hétérozygotes, porte les allèles 158 et 162.

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 en Europe 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.

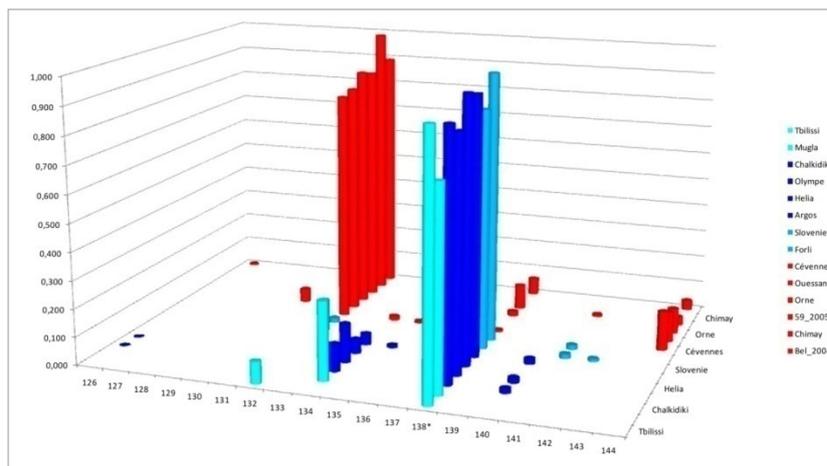


figure 6 : histogramme des fréquences de 14 populations d'abeilles au locus A28. Le premier axe représente les différents allèles présents dans la population (représentés par leur taille), le second axe la fréquence de chacun des allèles et le troisième axe est celui des populations. Les populations des lignée 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 13 locus microsatellites (A124, A43, A88, A24, Ap33, A8, A113, Ap43, A7, A28, 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 NUES (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 DISTRUCT 1.1 (Rosenberg, 2004) permet de représenter graphiquement les résultats.

Résultats :

I/ Analyse de la population d'abeille de l'Ile Groix de 2017

1 Caractérisation de l'origine maternelle des ouvrières:

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

La totalité des 208 colonies échantillonnées a pu être amplifiées et analysée. 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.

Individu	Long.	Haplo.
AGX_1	PQQ	M 4
AGX_2	PQQ	M 4
AGX_3	PQQ	M 4
AGX_4	PQQ	M 4
AGX_5	PQ	M 6
AGX_6	PQQ	M 4
AGX_7	PQQ	M 4
AGX_8	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.

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

Un exemple de gel de migration en poly-acrylamide, après digestion du produit de PCR par l'enzyme *DraI*, est présenté en annexe 2. L'ensemble des résultats du test mitochondrial est présenté en annexe 3. 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 de l'Ile de Groix a permis de révéler la présence de 5 haplotypes (profils de migration) différents appartenant tous à la lignée évolutive M. Il est à noter qu'aucun haplotype originaire des lignées C/O, A et Z n'a été détecté dans la population.

Parmi les 208 colonies étudiées sur l'Ile de Groix, 100% ont des profils mitochondriaux de type M (figure 7). Le tableau 2 présente les fréquences de chacun des haplotypes dans la population échantillonnée.

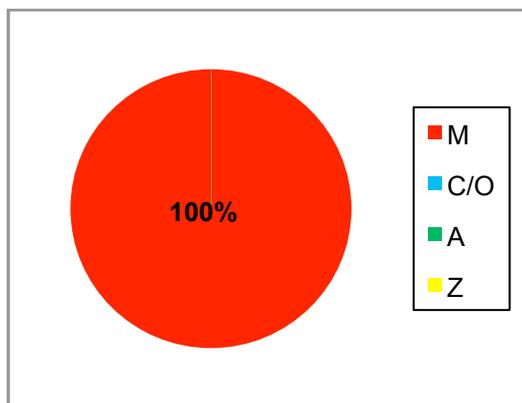


figure 7 : diagramme des fréquences des différentes lignées dans la population.

Haplo.	Freq.
M 4	0,918
M 4'	0,005
M 6	0,010
M 32'	0,058
M 51	0,010

Tableau 2 : Fréquence des différents haplotypes observés dans la population

La figure 8 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, ceux de la lignée A en vert et ceux du Proche Orient en jaune. Aucun haplotype mitochondrial importé n'a été trouvé sur l'île.

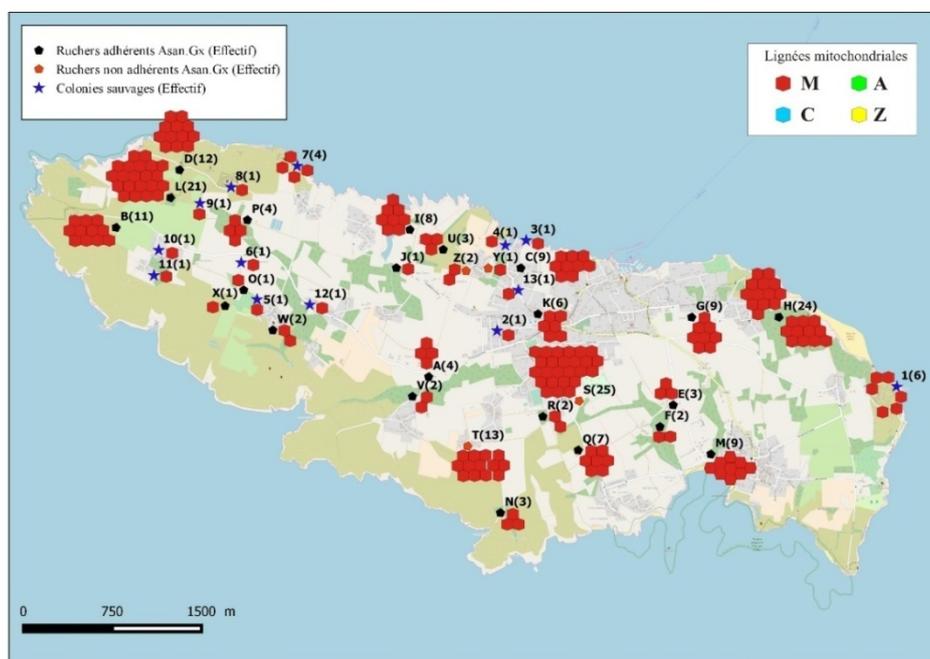


Figure 8 : montrant la localisation des lignées mitochondriales dans la zone échantillonnée. La répartition des types mitochondriaux est représentée en fonction des différents ruchers (hexagones collés). Les types mitochondriaux d'origine M (locale) sont en rouge, les types C (Nord-méditerranéens) en bleu, les types A (africains) en vert et Z (proche-orient) en jaune (ces trois derniers types sont absents de l'étude).

Diversité des haplotypes M :

La figure 9 présente les fréquences des différents haplotypes M dans la population étudiée. L'analyse de la population d'abeilles de l'île de Groix met en évidence la présence de 5 haplotypes différents appartenant à la lignée mitochondriale M.

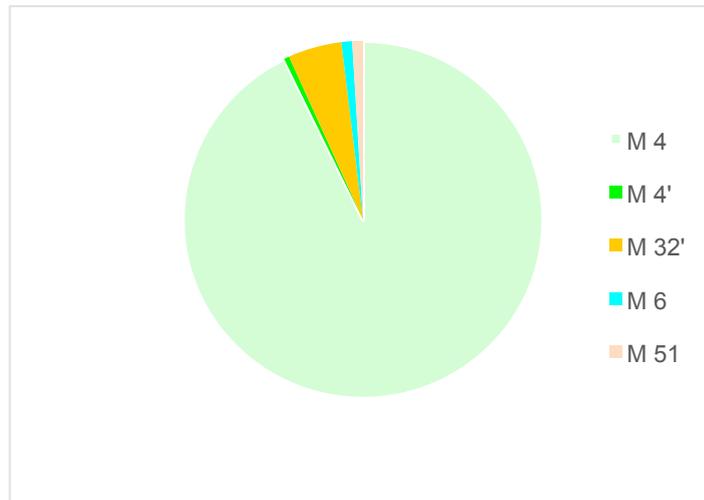


Figure 9 : Diagramme présentant les fréquences des 5 différents haplotypes M dans la population d'abeilles de l'île de Groix.

L'haplotype M le plus fréquent est le M 4, et représente 91,8 % des haplotypes de la population échantillonnée. Il correspond à l'haplotype le plus commun observé en France, avec les haplotypes M4' (représentant ici 0,5% des haplotypes M) et M 6 (1% des haplotypes M). Ces trois haplotypes peuvent correspondre à des haplotypes d'origine locale.

L'haplotype M51 (observé à 2 reprises) est observé dans le rucher L du nord ouest de l'île. C'est un haplotype trouvé habituellement à l'Ouest de l'île de France et qui a été observé également dans l'Orne. Cet haplotype, peu fréquent dans la population de l'île de Groix, semble être compatible avec un haplotype local.

L'haplotypes M32' (5,8% des haplotypes M) est un haplotype essentiellement observé sur l'île de Groix. Présent essentiellement au nord ouest de l'île, il semble actuellement endémique de l'île de Groix et n'a jamais été observé dans une autre population française, y compris dans la population du Morbihan. La présence de cet haplotype sur l'île est spécifique et permet de typifier la population.

1-3 Répartition géographique des haplotypes de la lignée M:

La figure 10 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.

Bien que la diversité en haplotype soit faible, on constate une certaine hétérogénéité dans la composition des différents ruchers. En particulier, ce sont essentiellement les ruchers situés au Nord-Ouest de l'île qui présentent l'haplotype M32', et plus particulièrement le rucher D qui contient 6 des 12 colonies ayant cet haplotype. Cette concentration à l'échelle de la population est sans doute à mettre au compte des pratiques apicoles telles que l'élevage de reine ou la division de colonies et d'un échange de colonies limité entre les apiculteurs.

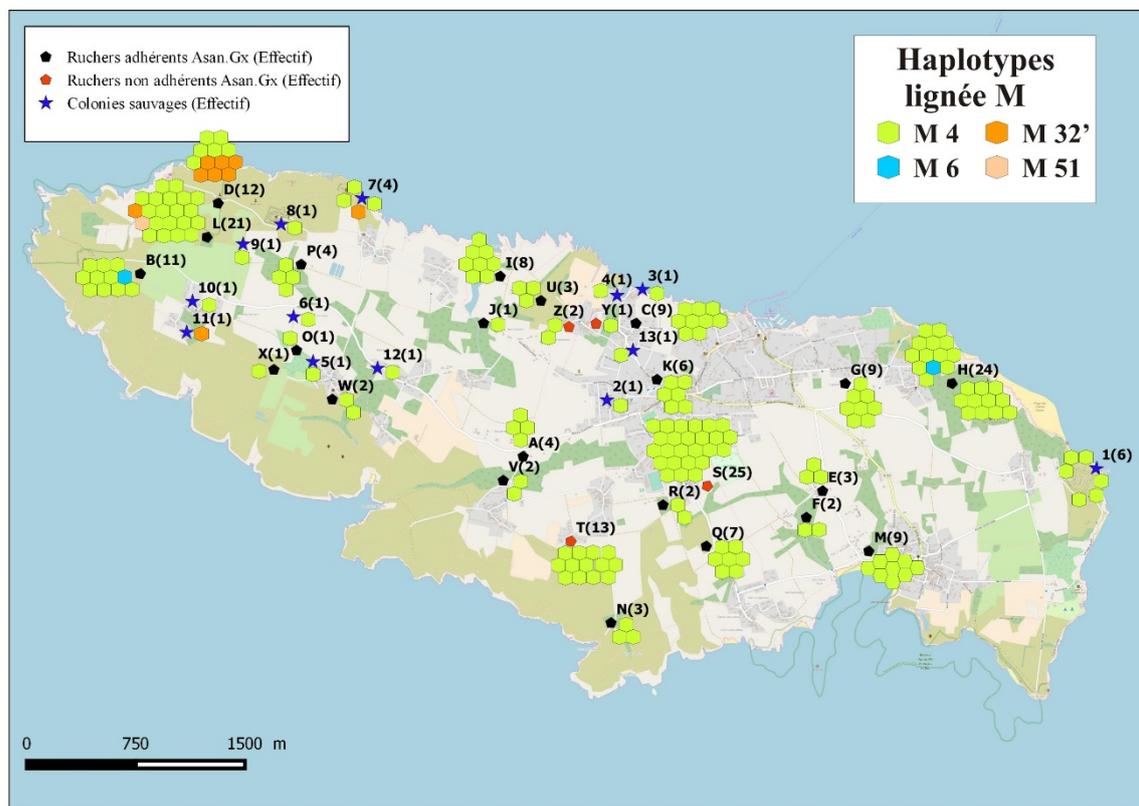


Figure 10 : Cartographie de la diversité mitochondriale intra-lignée. Chaque haplotype est représenté par une couleur différente. Les haplotypes de la lignée M sont représentés en couleur, ceux de la lignée C en niveaux de gris (absents de cette étude).

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.

Dans le cadre de 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). Dans le cas de l'Ile de Groix, comme aucun haplotype importé n'a été observé, les diversités haplotypiques brute corrigées sont les mêmes.

La diversité haplotypique de la population est ainsi estimée à **0,154**. Cette diversité haplotypique est faible comparée à la diversité haplotypique des populations continentales (comprise entre 0,3 et 0,5) et probablement le résultat d'un effet de fondation de cette population insulaire accompagné d'un faible flux de gènes naturel entre la population de l'Ile et la population continentale.

Pour conclure, la population d'abeilles de l'Île de Groix échantillonnée montre donc 100% de types mitochondriaux appartenant à la lignée M. Les haplotypes M observés sont tous compatibles avec une origine locale de la diversité observée.

Cette population correspond donc à l'une des populations les plus pures en abeilles de la lignée mitochondriale Ouest méditerranéenne. C'est à l'heure actuelle avec la population de l'Île d'Ouessant la seule population ne montrant aucune trace d'haplotypes mitochondriaux importés. Comme pour l'Île d'Ouessant, la population de l'Île de Groix montre une diversité mitochondriale relativement faible comparée à la diversité des populations continentales qui est probablement à mettre en relation avec l'isolement lié à l'insularité et à un effectif populationnel plus faible.

2 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 un 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 l'Île de Groix.

1/ Analyse globale :

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

Afin de replacer la population de Groix 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 (Groix et populations de référence des différentes lignées). La figure 11 présente le résultat de l'analyse hiérarchique de ces populations (Neighbor-Joining sur les distances inter-populations).

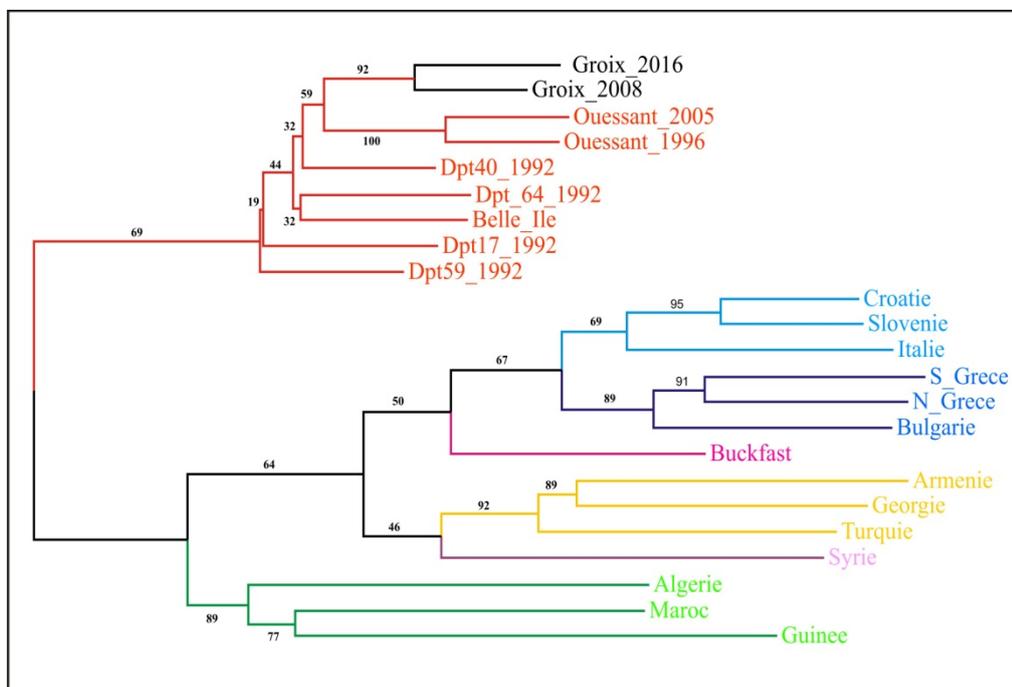


Figure 11: arbre de classification hiérarchique calculé à partir des distances de Cavalli-Sforza et Edwards (1967) et de 13 loci microsatellites. Les valeurs de « Bootstrap », notées en pourcentages, ont été obtenues avec 2000 itérations d'un ré-échantillonnage aléatoire des individus (Garnerly et al. 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), d'Ouessant (1996 et 2005), des Pyrénées Atlantiques (Dpt_64), du Nord (Dpt59), de Belle-Ile pour *Apis mellifera mellifera*
- La lignée C : représentées par les populations d'Italie, de Slovénie, de Croatie, de Grèce et de Bulgarie.
- La lignée A : représentée par les populations de Guinée, d'Algérie et du Maroc.
- La lignée O : représentée par les populations de Turquie, d'Arménie et du Caucase (Géorgie).
- Le groupe Z (voir Alburaki *et al.* 2011): représenté par la population de Syrie qui sort à la base de la lignée O.

Un échantillonnage d'abeilles de la lignée synthétique Buckfast et été ajouté à l'étude et vient se placer à la base de la lignée C.

Les lignées M, A et l'ensemble C et O sont en général bien distinguées entre elles avec des valeurs de bootstrap importantes. Le groupe Z est situé à la base du groupe O (valeur de bootstrap = 92%).

L'étude hiérarchique montre clairement que la population de Groix échantillonnée en 2017 vient se placer en plein cœur de la lignée M. La population de Groix de 2017 montre également une grande proximité avec la population de Groix échantillonnée en 2008 puisque ces deux populations se branchent ensemble dans l'arbre. Ces deux échantillons de Groix sont situés à proximité des deux échantillons de l'Ile d'Ouessant (1996 et 2005) mais s'en distingue par des longueurs de branches et des valeurs de bootstrap importantes (92% et 100%). Ceci montre bien que ces deux groupes de populations (Groix et Ouessant) sont bien représentatives de la lignée M, mais sont distinctes entre elles sur le plan génétique.

La population d'abeilles de Groix se distingue donc bien des populations de référence A, C, O et Z et forment un groupe cohérent avec les populations de référence M. La taille importante de la branche située à la base des deux échantillons de Groix est sans doute le reflet d'une variabilité intra-populationnelle plus faible sur l'Ile de Groix probablement à mettre en relation avec le caractère insulaire de la population et un moindre effectif populationnel .

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 Groix et les populations de référence est représentée en figure 12.

Les deux premiers axes de l'ACP absorbent 68,1% de la variance génétique totale ce qui est important dans la représentation de la diversité génétique dans un espace comprenant 22 dimensions. Le premier axe de l'ACP qui représente 54,35% de la variance exprimée, oppose les populations de références C, O, Z et Buckfast situées à droite de la figure, aux populations références de la lignée M (situées à gauche). Ce premier axe montre très clairement que 54,35 % de la variabilité génétique totale exprimée est lié à une séparation entre les populations de référence M (Landes, Nord, Ouessant, etc...) et les populations de référence Z, O et C (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 l'Ile de Groix échantillonnée en 2017 apparaît clairement en plein cœur des populations de référence M. L'échantillon de Groix de 2008 est également situé au centre des populations M mais légèrement décalé vers la droite.

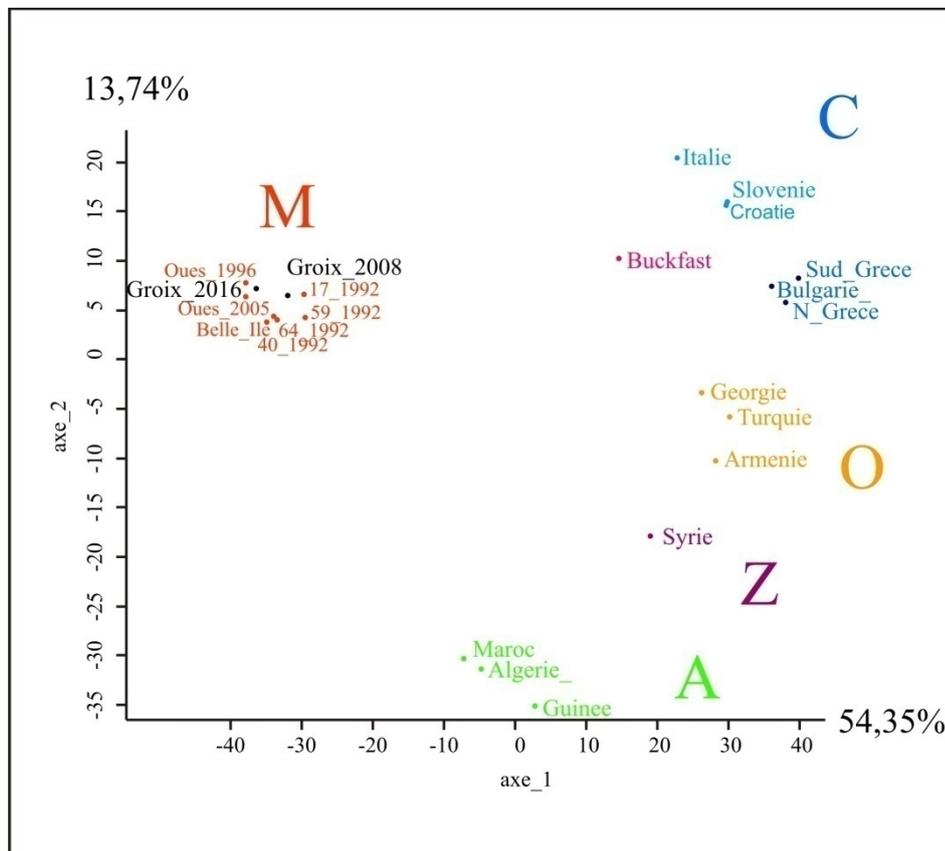


Figure 12 : Projection selon les axes 1 et 2 de l'analyse en Coordonnées Principales (ACP) des populations de références des lignées M (en rouge : Dpt59_1992, Ouessant_1996 et 2005, Dpt64_1992, Dpt40_1992, etc.), C (en Bleu : Bulgarie, Grèce Nord et Sud, Slovenie, Croatie et Italie), A (en Vert : Algérie, Maroc, et, Guinée), O (en Jaune : Turquie Arménie et Géorgie), Z (en violet : Syrie) et d'une population de lignée Buckfast (en rose : multi-hybride sélectionné). Les deux échantillons de Groix 2008 et 2017 sont représentés en noir.

Il apparaît ici clairement que la population échantillonnée sur l'île de Groix fait partie du groupe représentant la lignée M et ne semble pas avoir été influencée de manière significative par des importations d'abeilles des lignées C, O et A.

Le deuxième axe, exprime environ 13,74% de variabilité supplémentaire. Les projections des populations selon cet axe opposent clairement les populations africaines (lignée A), de Syrie (lignée Z) et de la lignée Orientale (Caucase et Turquie) aux autres lignées évolutives. La position très haute sur le graphique de la population de l'île de Groix sur cet axe montre clairement qu'il n'y a pas d'influence notable des populations africaines et Orientales qui sont plutôt positionnées en bas de l'axe 2.

Le troisième axe de l'analyse (figure 13), qui représente 8,75% de la variance du système, oppose clairement les populations O (Turquie, Arménie et Caucase) et Z (Syrie) aux populations C et A. Les populations de référence de la lignée M forment un groupe homogène restant au centre de l'axe. La population de l'île de Groix se trouve au sein de ce groupe homogène de populations M.

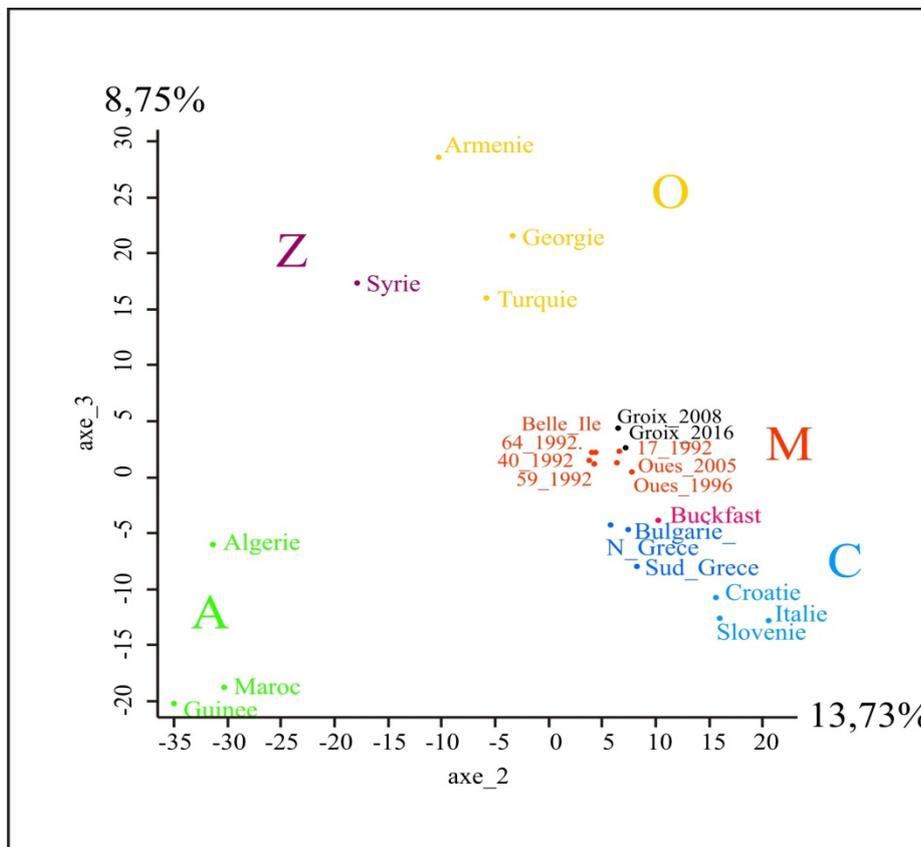


Figure 13 : Projection selon les axes 2 et 3 de l'analyse en Coordonnées Principales (ACP) des populations de références des lignées M (en rouge : Dpt59_1992, Ouessant_1996 et 2005, Dpt64_1992, Dpt40_1992 etc.), C (en Bleu : Bulgarie, Grèce Nord et Sud), Slovenie, Croatie et Italie), A (en Vert : Algérie, Maroc et Guinée), O (en Jaune : Turquie, Arménie et Géorgie), Z (en violet : Syrie) et d'une population de lignée Buckfast (en rose : multi-hybride sélectionné). Les deux échantillonnages réalisés sur l'île de Groix sont représentés en noir.

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

2-1/ Diversité génétique de la population

Les paramètres de variabilité de la population d'abeilles de l'île de Groix sont présentés pour chacun des 13 loci dans le tableau 3. Ainsi, les fréquences alléliques, et les hétérozygoties calculées et observées par locus sont présentées pour comparaison avec 3 populations différentes de la lignée M. Dans ce tableau, chaque cadre entouré de traits épais représente un locus. Pour chaque locus la première colonne représente le nom du locus, la seconde colonne donne la taille de chaque allèle observé dans les populations au locus considéré et les quatre colonnes expriment respectivement la fréquence de chacun de ces allèles dans la population d'abeilles de l'île d'Ouessant, dans les populations de l'île de Groix (échantillonnages de 2017 et de 2008) et dans une population continentale.

Les deux dernières lignes de chaque cadre représentent respectivement l'hétérozygotie observées (H_o), et l'hétérozygotie calculée sous l'hypothèse de Hardy-Weinberg (H_c).

La population d'abeilles de l'île de Groix présente un nombre moyen d'allèles (N_a) par locus observé de 4,54 et une hétérozygotie moyenne par locus (H_c) de **0,333**. Cette population montre donc une variabilité intermédiaire entre la population d'Ouessant ($N_a = 3,54$; $H_c = 0,307$) et la population continentale de Valenciennes ($N_a = 5,54$; $H_c = 0,424$).

Locus	Allele	Ouessant	Groix(2017)	Groix(2008)	Valenc.	Locus	Allele	Ouessant	Groix(2017)	Groix(2008)	Valenc.
B124	(pb)	(n= 100)	(n = 115)	(n = 78)	(n = 58)	Ap33	(pb)	(n= 100)	(n = 206)	(n = 78)	(n = 58)
	216				0,034		227	0,020	0,005	0,033	0,138
	218				0,017		231			0,007	
	220	0,080	0,039	0,096	0,241		235		0,296	0,299	0,017
	222		0,270	0,321	0,086		237		0,090	0,078	0,034
	224	0,210	0,252	0,096	0,155		239	0,120	0,063	0,026	0,017
	226		0,026	0,032	0,017		241	0,030	0,141	0,169	0,034
	228	0,040	0,161	0,064	0,086		243	0,330	0,053	0,084	0,172
	230	0,200	0,052	0,083	0,069		245	0,260	0,019	0,033	0,172
	232	0,080	0,074	0,051	0,086		247	0,210	0,119	0,065	0,138
	234	0,260	0,035	0,077	0,069		249	0,010	0,027	0,039	0,121
	236				0,069		251				0,086
	238	0,130	0,091	0,154	0,017		253	0,020	0,175	0,149	0,052
	240				0,034		255		0,002	0,020	
	242				0,017		257				0,017
	248			0,026		Ho		0,800	0,832	0,840	0,828
Ho		0,780	0,843	0,846	0,828	Hc		0,771	0,826	0,834	0,890
Hc		0,825	0,821	0,839	0,893						
Locus	Allele	Ouessant	Groix(2017)	Groix(2008)	Valenc.	Locus	Allele	Ouessant	Groix(2017)	Groix(2008)	Valenc.
B24	(pb)	(n= 100)	(n = 208)	(n = 78)	(n = 58)	Ap81	pb	(n= 100)	(n = 208)	(n = 78)	(n = 58)
	98	0,920	0,954	0,930	0,810		128	1,000	0,990	0,962	0,931
	106	0,080	0,039	0,058	0,138		136		0,010	0,026	0,069
	108*		0,007	0,013	0,052		146			0,013	
Ho		0,160	0,091	0,14103	0,276	Ho		0,000	0,019	0,077	0,138
Hc		0,149	0,088	0,133	0,327	Hc		0,000	0,019	0,075	0,131
Locus	Allele	Ouessant	Groix(2017)	Groix(2008)	Valenc.	Locus	allele	Ouessant	Groix(2017)	Groix(2008)	Valenc.
A113	(pb)	(n= 96)	(n = 208)	(n = 78)	(n = 58)	Ap55	pb	(n= 100)	(n = 208)	(n = 78)	(n = 56)
	202	0,120	0,005		0,172		173			0,006	0,036
	214*	0,020		0,006	0,034		175	0,010		0,026	0,054
	218	0,010	0,031	0,006			177	0,100	0,041		0,107
	220	0,810	0,789	0,782	0,724		179	0,580	0,380	0,353	0,536
	222		0,094	0,115	0,017		181	0,210	0,084	0,064	0,125
	226		0,012	0,032	0,034		183	0,100	0,495	0,551	0,071
	228	0,040	0,070	0,051	0,017		185				0,036
	230			0,006			191				0,036
Ho		0,340	0,370	0,385	0,483	Ho		0,680	0,587	0,590	0,786
Hc		0,331	0,364	0,374	0,451	Hc		0,605	0,603	0,571	0,686
Locus	Allele	Ouessant	Groix(2017)	Groix(2008)	Valenc.	Locus	Allele	Ouessant	Groix(2008)	Groix(2017)	Valenc.
A7	(pb)	(n= 100)	(n = 208)	(n = 78)	(n = 56)	Ap66	pb	(n= 100)	(n = 208)	(n = 78)	(n = 56)
	105			0,013			92		0,002		
	107				0,018		94		0,002	0,032	
	111	1,000	0,952	0,910	0,893		99		0,005		
	113		0,048	0,058	0,054		100	0,160	0,457	0,481	0,554
	116*				0,018		101	0,670	0,301	0,263	0,393
	118*				0,018		102	0,090	0,231	0,224	
	138			0,013			103	0,080	0,002		0,036
	140			0,006			112				0,018
Ho		0,000	0,096	0,167	0,143	Ho		0,520	0,678	0,667	0,464
Hc		0,000	0,092	0,169	0,203	Hc		0,516	0,649	0,653	0,547

Locus	Allele	Ouessant (n= 100)	Groix(2017) (n = 208)	Groix(2008) (n = 78)	Valenc. (n = 58)	Locus	Allele	Ouessant (n= 100)	Groix(2017) (n = 208)	Groix(2008) (n = 78)	Valenc. (n = 58)
A88	(pb)					A28	(pb)				
	143			0,019			130	0,050			
	146	0,970	0,983	0,974	0,983		132	0,840	0,858	0,763	0,966
	154*	0,020	0,010	0,006	0,017		138*		0,007	0,032	0,034
	155	0,010	0,007				144	0,110	0,135	0,205	
Ho		0,060	0,034	0,051	0,034	Ho		0,320	0,212	0,218	0,069
Hc		0,052	0,033	0,051	0,034	Hc		0,283	0,246	0,211	0,068
Locus	Allele	Ouessant (n=100)	Groix(2017) (n = 208)	Groix(2008) (n = 78)	Valenc. (n = 56)	Locus	Allele	Ouessant (n = 100)	Groix(2017) (n= 207)	Groix(2008) (n = 78)	Valenc. (n = 58)
A43	(pb)					A8	(pb)				
	118		0,002				148	0,960	0,998	0,962	0,793
	127*		0,002				154				0,017
	128	0,790	0,827	0,885	0,804		156	0,020	0,002	0,019	0,138
	140	0,210	0,166	0,083	0,143		158*	0,020		0,013	
	141*		0,002	0,019	0,054		160*				0,017
Ho		0,340	0,288	0,218	0,321		162*			0,006	0,017
Hc		0,335	0,289	0,211	0,337		164*				0,017
Locus	Allele	Ouessant (n= 100)	Groix(2017) (n = 208)	Groix(2008) (n = 78)	Valenc. (n = 58)	Ho		0,080	0,005	0,077	0,414
Ap43	(pb)					Hc		0,078	0,005	0,075	0,357
	135	0,020	0,180	0,141	0,345						
	137	0,980	0,820	0,827	0,552						
	139				0,052						
	143*			0,006	0,017						
	145*				0,034						
	177			0,006							
	181			0,013							
	201			0,006							
Ho		0,040	0,322	0,269	0,759						
Hc		0,040	0,296	0,298	0,583						

Tableau 3 : présentant les paramètres de variabilité de la population d'abeilles de Groix pour chacun des 13 loci étudiés. Ces paramètres sont présentés en comparaison avec ceux 2 autres populations de la lignée M (Ouessant_1996, et Valenciennes_1992) et ceux d'un échantillonnage réalisé sur l'île de Groix en 2008.

2-2/ Structuration génétique de la population:

Le test global de l'équilibre de Hardy Weinberg sur l'ensemble des 13 locus étudiés montrent que les 208 colonies échantillonnées sur l'île de Groix forment un groupe panmictique ($p = 0,45$). Sur les 13 loci étudiés, seul un locus (Ap66) montre un déséquilibre à la limite du test statistique ($p = 0,0452$).

L'analyse des déséquilibres de liaisons entre locus vient confirmer cette observation puisque la population totale montre que seuls 8 couples de locus sur les 78 couples comparés, sont en déséquilibres de liaison (pour $p < 5\%$). En descendant le test à $p < 1\%$, seul un déséquilibre de liaison est encore présent (couple A28 vs B24).

La population dans sa globalité est par conséquent panmictique. Il semble donc que la reproduction soit réalisée de manière panmictique dans l'ensemble de l'île de Groix et qu'il n'existe pas de sous structuration en sous population (naturelle ou artificielle).

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 14). Les résultats des classements sont représentés en figure 14.

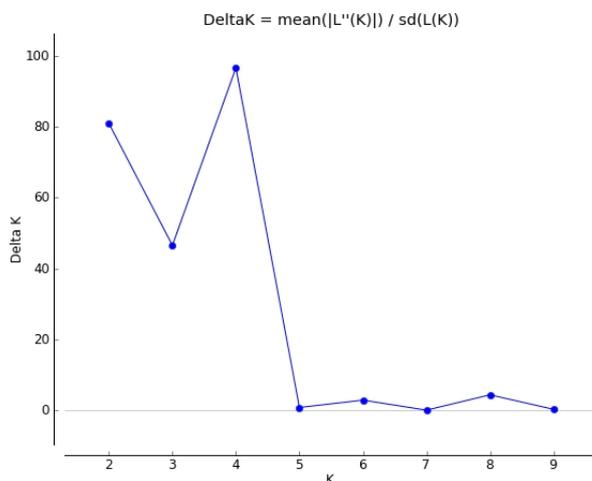


Figure 14 : Calcul de la statistique du ΔK d'après Evanno *et al.* (2005), permettant de définir sans a priori le nombre de groupe parmi les échantillons étudiés (Groix et groupes de référence).

Nous avons choisi de représenter les résultats pour $K=4$ (figure 15) qui correspond à la meilleure statistique du ΔK obtenu d'après Evanno *et al.* 2005. Dans ces figures, un groupe est représenté par une couleur. A chaque échantillon (barre verticale) est affecté un pourcentage de classement pour chacun des K groupes.

En considérant quatre groupes génétiquement homogènes (figure 15), tel que suggéré par la statistique *Ad hoc* du ΔK , on identifie sans ambiguïté les lignées de référence M et C respectivement en rouge et en bleu. D'autre part les lignées O et Z forment un groupe génétiquement homogène (jaune) et la lignée A est en vert. Ce dernier résultat est cohérent avec les résultats obtenus avec les analyses multivariées. Les échantillons de l'Ile de Groix montrent une grande homogénéité et révèlent des profils similaires au groupe de populations de références de la lignée M. Les probabilités de classement pour chaque échantillon de Groix dans le groupe M sont, entre autre, meilleures que les populations de références M.

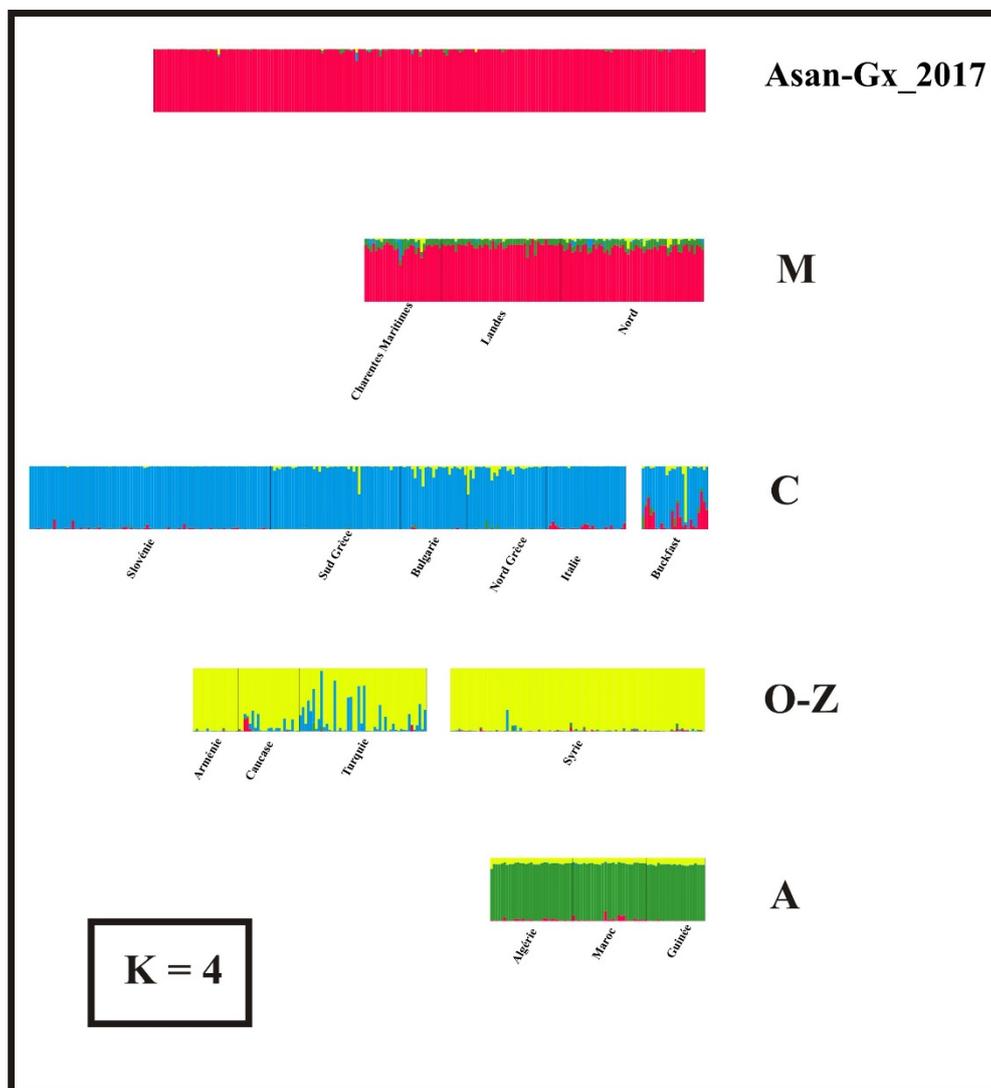


Figure 15 : Représentation des probabilités de classement de chaque individu de la population d'abeilles de l'Ile de Groix pour $K = 4$ groupes.

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 originaire 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. Ce niveau d'introgression est estimé à **1%** pour l'ensemble de la population d'abeilles de l'Ile de Groix ce qui est assez proche de l'estimation obtenue avec l'ADN mitochondrial (0%).

Compte tenu du fait que les locus sont diagnostiques à 95% **la population peut être considérée comme particulièrement pure en abeilles noires.**

Ce pourcentage d'introgression est présenté en détail pour chaque échantillon (colonie) en colonne 2 de l'annexe 4. Le pourcentage d'introgression pour chaque rucher est présenté en figure 16.

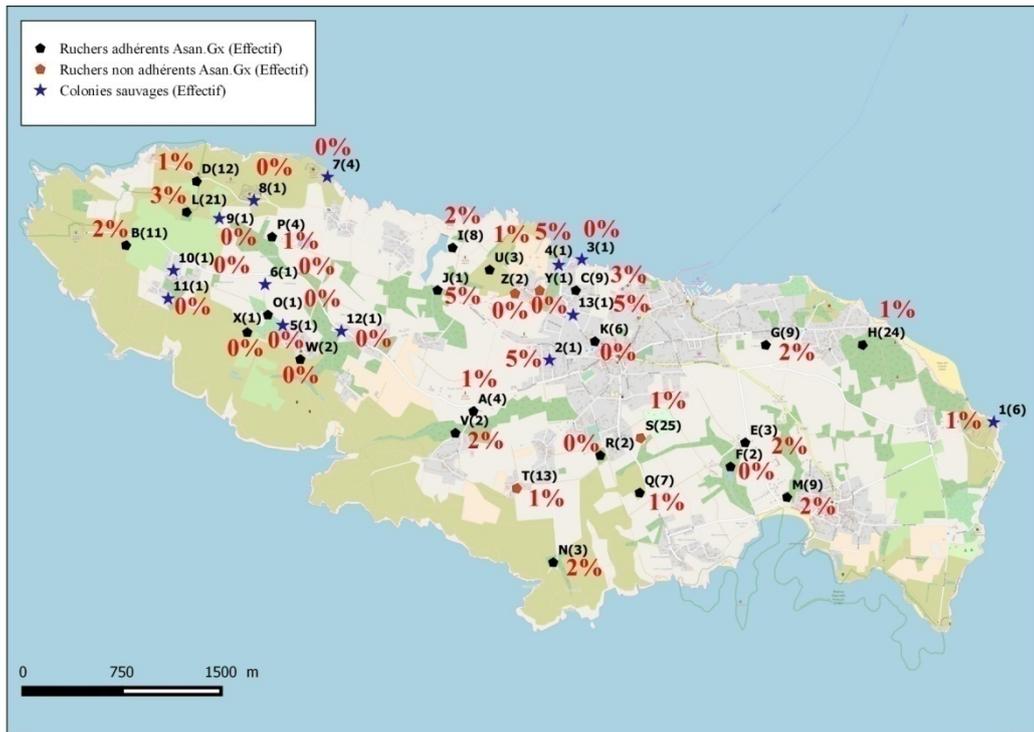


Figure 16 : pourcentage d'introgression par rucher pour l'ensemble des ruchers de l'étude.

Pour chaque rucher, le niveau d'hybridation est relativement faible (<5%) et relativement homogène sur l'île. Il ne semble pas qu'il y ait une structuration particulière des hybridations sur l'île et les différences d'estimation de niveaux d'hybridation observées entre les ruchers semblent plus être reliées à l'échantillonnage qu'à une structure des introgressions. En particulier, les ruchers composés d'un plus grand nombre de colonies semblent avoir un niveau d'hybridation qui converge vers 1 % ce qui correspond au niveau d'hybridation moyen de la population.

3-2/ Test d'assignation à une lignée évolutive

Les tests d'assignation des colonies à des populations de référence d'origine M, C, A ou O nous permettent de déterminer une probabilité d'appartenance d'un échantillon à l'une de ces lignées évolutives. 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 conservatoire.

Le résultat des tests d'assignation est présenté 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 représentées dans notre base de données en utilisant les méthodes Bayésienne et fréquentielle.

3-2/ Résultats de ACP inter-individuelles :

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.

Compte tenu de l'apparente homogénéité de la structure de la population observée avec l'ADN mitochondrial, les projections de l'ensemble des individus ont été réalisées en regroupant tous les échantillons de l'Ile. Les projections par ruchers n'ont pas été réalisées du fait de la petite taille de l'échantillonnage par rucher.

Sur les graphiques de projections, les populations de références des lignées M, A, C, O et Z ainsi que l'échantillonnage de référence de la souche Buckfast sont représentées par les contours de chacune des populations. Ces contours sont représentés respectivement en rouge, vert, Bleu, jaune et Violet. Le contour d'échantillons de la lignée synthétique Buckfast est de couleur rose.

Chaque échantillon de l'Ile de Groix est représenté de manière individuelle par un point de couleur noir. Les projections des individus selon les deux premiers axes de l'analyse en coordonnées principales sont présentées en figure 17. Sur cette figure, les populations des différentes lignées évolutives sont bien séparées.

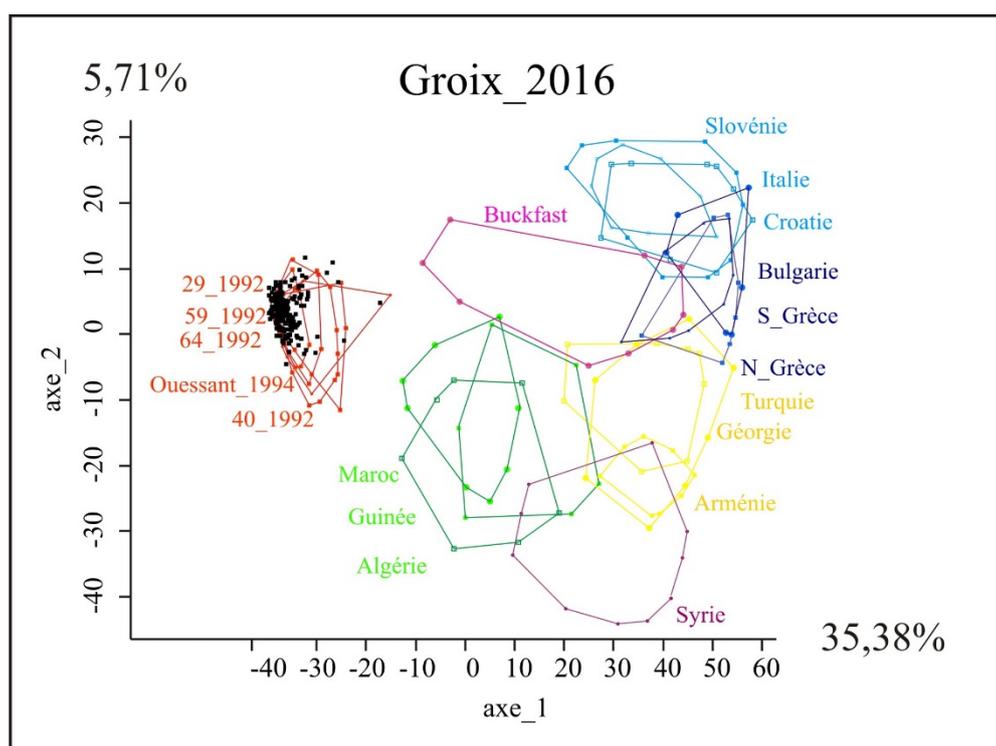


Figure 17 : Projections de l'ensemble des individus de l'Ile de Groix selon les deux premiers axes de l'Analyse en Coordonnées Principales (ACP) réalisée avec la matrice des distances inter-individuelles. Seuls les pourtours des nuages de points, représentant l'ensemble des individus de chaque population de référence, ont été représentés.

L'axe 1, qui représente 35,38% de la variance exprimée oppose clairement les populations de référence de la lignée M (en rouge) aux populations des lignées C, O, et Z. La lignée A reste relativement centrale sur cet axe. Le second axe, qui représente 5,71% de la variance exprimée, oppose les populations de la lignée C aux populations des lignées O, A et Z. La lignée M reste relativement centrée sur cet axe.

Les 208 points représentant l'échantillonnage de l'Ile de Groix sont situés dans les contours des populations de référence de la lignée M ou à très grande proximité. Cet ensemble de points est compact et situé plutôt sur la gauche des références M. Quelques points semblent s'en détacher vers la droite et le point le plus éloigné correspond à l'échantillon AGX_77 qui exprime un niveau d'hybridation de 18% (voir annexe 4).

Cette analyse vient donc confirmer la grande pureté des abeilles de l'île de Groix observée avec les méthodes d'analyses précédentes, population qui forme un groupe homogène et typique de la lignée M.

II/ Comparaison avec les données de l'échantillonnage réalisé en 2008 :

Suite à l'introduction d'un nombre important de colonies allochtones sur l'île, un échantillonnage avait été réalisé sur l'île de Groix en 2008. Bien que les colonies introduites aient été éliminées rapidement, l'objectif de cet échantillonnage était de rechercher un impact potentiel de cette introduction sur les populations d'abeilles. A cette époque, seul l'ADN mitochondrial avait été utilisé comme marqueur. Nous avons profité de l'opportunité d'analyser l'échantillonnage réalisé en 2017 pour étudier la diversité de la population insulaire de 2008 afin de comparer les résultats.

1/ Résultats de l'ADN mitochondrial

L'analyse de l'échantillonnage de 2008 a permis de révéler la présence de 3 haplotypes (profils de migration) différents appartenant tous à la lignée évolutive M. Il est à noter qu'aucun haplotype originaire des lignées C/O, A et Z n'a été détecté dans la population.

Ainsi, comme dans le cas de l'échantillonnage de 2017, parmi les 100 colonies étudiées sur l'île de Groix en 2008, 100% ont des profils mitochondriaux de type M.

La figure 18 montre la répartition géographique des haplotypes dans la zone échantillonnée et par rucher. Sur cette figure chaque colonie échantillonnée est représentée par un hexagone. Les haplotypes de la lignée M sont en rouge, ceux de la lignée C en bleu, ceux de la lignée A en vert et ceux du Proche Orient en jaune. Aucun haplotype mitochondrial importé n'avait été trouvé sur l'île.

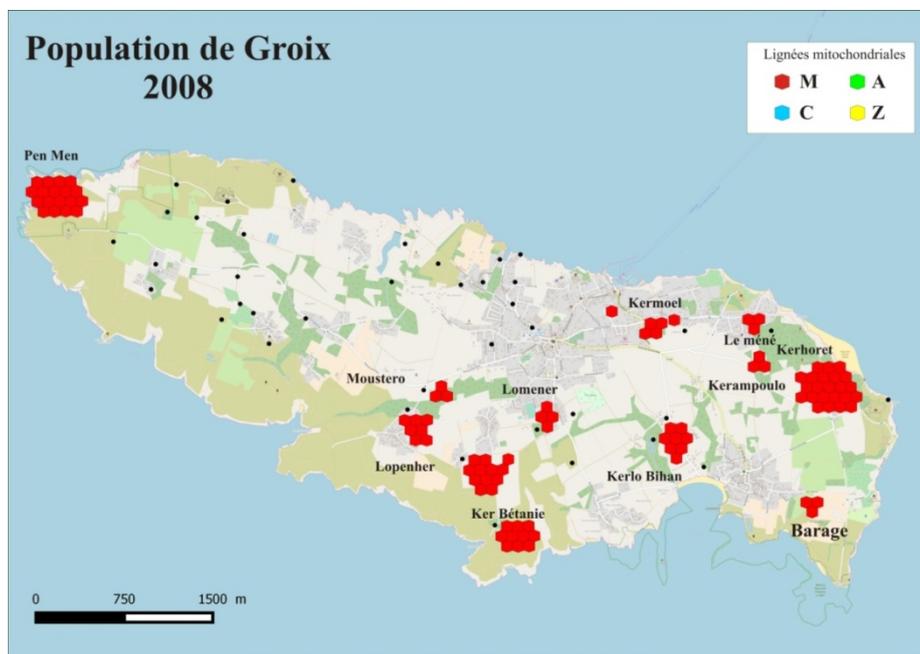


Figure 18 : présentant la localisation des haplotypes des différentes lignées sur l'île en 2008. La répartition des types mitochondriaux est représentée en fonction des différents ruchers (hexagones collés). Les types mitochondriaux d'origine M (locale) sont en rouge, les types C (Nord-méditerranéens) en bleu, les types A (africains) en vert et Z (proche-orient) en jaune (ces trois derniers types sont absents de l'étude).

Diversité des haplotypes M en 2008:

L'analyse de la population d'abeilles de l'Ile de Groix de 2008 a permis de mettre en évidence la présence de 3 haplotypes différents appartenant à la lignée mitochondriale M.

La figure 19 présente les fréquences des différents haplotypes M dans la population étudiée.

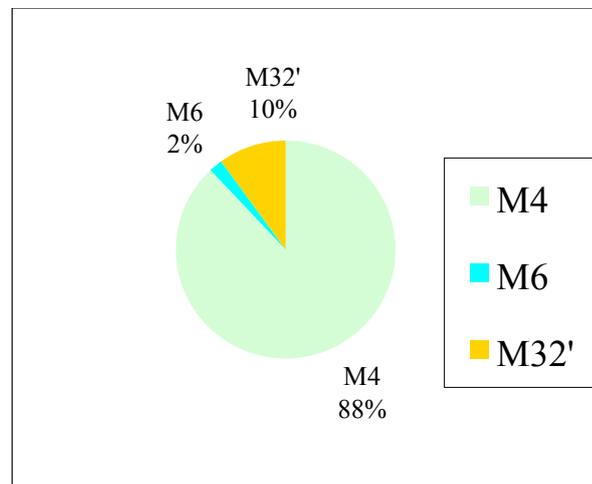


Figure 19 : Diagramme présentant les fréquences des 3 différents haplotypes M dans la population d'abeilles de l'Ile de Groix.

Répartition géographique des haplotypes de la lignée M:

La figure 20 illustre la répartition géographique des haplotypes M observés dans la zone d'étude en 2008. 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.

Bien que le nombre d'haplotype soit peu important, on constate une certaine homogénéité composition des différents ruchers. Contrairement à l'échantillonnage de 2017, l'haplotype M32' est réparti dans différents ruchers de l'Ile. Seul l'haplotype M 6 dont la fréquence est faible (2%) apparaît à 2 exemplaires dans un seul rucher. Ces deux colonies sont probablement des colonies apparentées.

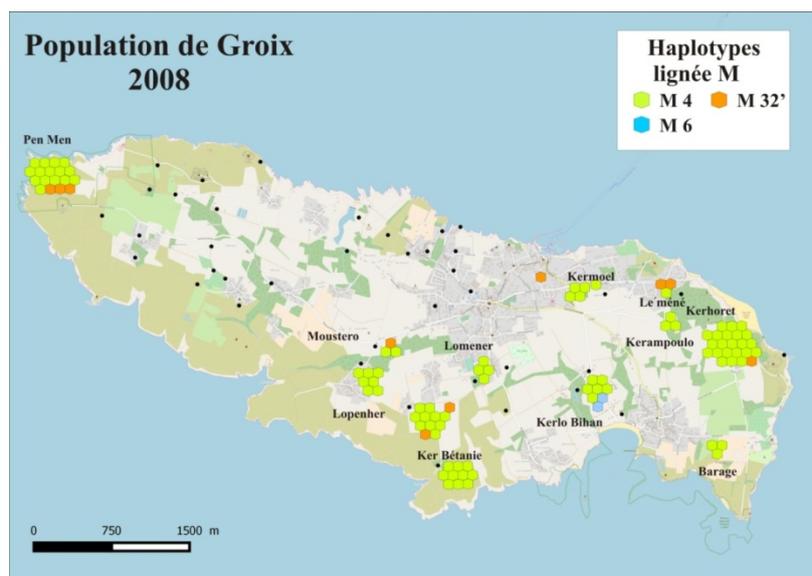


Figure 20: Cartographie de la diversité mitochondriale intra-lignée. Chaque haplotype est représenté par une couleur différente. Les haplotypes de la lignée M sont représentés en couleur, ceux de la lignée C en niveaux de gris (absents de cette étude).

Diversités haplotypiques

La diversité haplotypique de la population échantillonnée en 2008 est estimée à **0,217**. Cette diversité haplotypique est faible comparée à la diversité haplotypique des populations continentales (comprise entre 0,3 et 0,5), mais elle est supérieure à celle de la population échantillonnée en 2017.

Au niveau mitochondrial, aucune trace d'introgession n'était observée en 2008 suite à l'introduction d'abeilles allochtone sur l'Ile. Il ne restait donc pas de descendance maternelles de ces colonies importées sur l'ile une fois que celles-ci ont été éliminées.

2/ Diversité des marqueurs nucléaires (microsatellites)

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

La figure 11 montre la position de la population d'abeilles de l'Ile de groix échantillonnée en 2008. Cette population appartient bien à la lignée Ouest méditerranéenne puisqu'elle vient se brancher au sein des populations de référence de cette lignée. La population échantillonnée en 2008 vient se brancher à proximité de celle échantillonnée en 2017, qui forment ensemble un groupe de proximité génétique solide, séparé des autres groupes de la lignée M par une branche de taille importante accompagné d'une grande valeur de bootstrap (92%). L'appartenance à la lignée M et la grande proximité de deux échantillonnages sont confirmées avec l'analyse en coordonnées principales réalisées sur la matrice des distances inter-populations (fig 12 et 13).

1-2/ Diversité génétique de la population

Les paramètres de variabilité de la population échantillonnée en 2008 sont présentés pour chacun des 13 loci dans le tableau 3 (avec ceux de la population de 2017). Cette population présentait une hétérozygotie moyenne par locus de **0.346** pour un nombre moyen d'allèle par locus de 5,23. L'hétérozygotie moyenne par locus est donc passé de 0.346 en 2008 à 0,333 en 2017. En parallèle le nombre moyen d'allèles par locus est passé de 5,23 à 4,54 dans le même temps. On note donc une légère baisse de la diversité nucléaire pour cette période.

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

Le niveau d'introgession moyen estimé à partir de l'ensemble des échantillons de la population de 2008, est estimé à **4%**. Bien que plus bas que les populations continentales, Il était donc 4 fois supérieur en 2008 par rapport à 2017. Ce résultat est probablement la conséquence de l'installation des colonies allochtones sur l'Ile. Bien que l'ensemble de ces colonies aient été éliminées rapidement, des males issus de ces colonies ont probablement participé aux fécondations entre la période d'installation sur l'Ile et leur élimination.

Comme pour la population échantillonnée en 2017, le niveau d'hybridation de chaque individu a été estimé avec la méthode des allèles diagnostiques. La méthode de classement fondée sur les fréquences alléliques a également été utilisée, afin de déterminer dans quelle race était classé chaque individus. Le tableau 4 présente les 5 échantillons (parmi les 100 analysés) ayant niveau d'hybridation supérieur à 20% et qui ne sont pas classés à 100% dans la race mellifera. Parmi ces 5 individus 3 sont classés clairement dans un autre groupe que l'abeille noire (*A.m. mellifera*). Il est à noter que malgré les 25% d'hybridation de l'échantillon 56_313, celui-ci se classe à 99,8% dans la race mellifera.

Individu	All. Diag.	% classement	race
56_313	25%	99,8%	<i>A.m.mellifera</i>
56_323	42%	77,6%	Buckfast
56_327	46%	99,9%	Buckfast
56_332	42%	94,2%	<i>A.m.caucasica</i>
56_390	46%	66 %	<i>A.m.mellifera</i>

Tableau 4 : Pourcentage d'hybridation et classement des individus les plus hybridés. En première colonne est indiqué le n° de l'échantillon. La seconde colonne correspond au pourcentage d'hybridation estimé par la méthode des allèles diagnostiques. Les colonnes suivantes correspondent aux probabilités d'appartenance de chaque individu à une des 13 races de notre base de données selon la méthode fréquentielle (colonnes 3 et 4). Un échantillonnage de la souche Buckfast (multihybride sélectionné) sert de référence pour la classe hybride. Pour ces deux dernières colonnes, les deux colonnes indiquent respectivement la probabilité de classement et le classement de rang 1.

La figure 21 présente le résultat de l'analyse en coordonnées principales (ACP) réalisée sur la matrice des distances inter-individuelles. Sur ce graphique, les populations de références des lignées M, A, C, O et Z ainsi que l'échantillonnage de référence de la souche Buckfast sont représentées par les contours de chacune des populations.

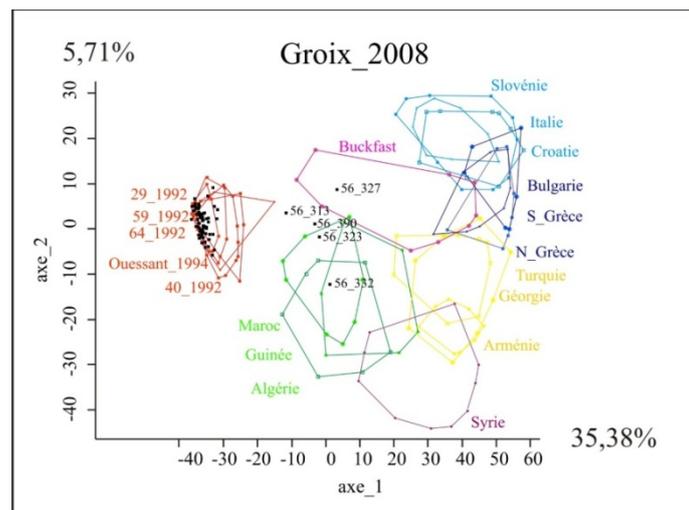


Figure 21 : Projections de l'ensemble des individus de l'île de Groix selon les deux premiers axes de l'Analyse en Coordonnées Principales (ACP) réalisée avec la matrice des distances inter-individuelles. Seuls les pourtours des nuages de points, représentant l'ensemble des individus de chaque population de référence, ont été représentés.

Ces contours sont représentés respectivement en rouge, vert, Bleu, jaune et Violet. Le contour d'échantillons de la lignée synthétique Buckfast est de couleur mauve. Chaque échantillon de l'Ile de Groix échantillonné est représenté de manière individuelle par un point noir accompagné du numéro d'échantillon correspondant lorsque celui-ci sort de la zone de référence de la lignée M.

L'axe 1, qui représente 35,38% de la variance exprimée oppose clairement les populations de référence de la lignée M (en rouge) aux populations des lignées C, O, et Z. La lignée A reste relativement centrale sur cet axe. Le second axe, qui représente 5,71% de la variance exprimée, oppose les populations de la lignée C aux populations des lignées O, A et Z. La lignée M reste relativement centrée sur cet axe. La plupart des points représentant l'échantillonnage de 2008 est situé dans les contours des populations de référence de la lignée M. Ce nuage de points est compact et situé plutôt à gauche des références M ce qui témoigne de la pureté de ces échantillons. Quelques points (56_313, 56_323, 56_327, 56_332 et 56_390) sont situés en positions intermédiaires entre les références M et les populations de référence C, et O. Ces 5 points correspondent aux échantillons montrant des niveaux d'hybridation importants. L'ACP inter-individuelle vient donc confirmer le caractère hybride de ces 5 échantillons.

L'analyse de l'échantillonnage réalisé en 2008 montre une population pure en abeilles noires puisque aucune colonie ne comporte d'ADN mitochondrial de type allochtone. L'analyse de l'ADN nucléaire vient confirmer celle de l'ADN mitochondrial, la population montrant une hybridation moyenne de 4% ce qui est de l'ordre du pouvoir de discrimination de nos marqueur. Toutefois l'analyse par individu montre la présence de 5 échantillons présentant des niveaux d'hybridation supérieurs à 25% et dont certains sont proches de 50%. Ces individus correspondent probablement à des hybrides de première génération issus de fécondation par des males qui auraient pu provenir des colonies installées sur l'Ile (entre le moment de leur installation et leur élimination).

CONCLUSION / PRECONISATIONS

Quelque soit le marqueur utilisé (ADN mitochondrial ou marqueurs microsatellites), la population d'abeilles de l'Ile de Groix apparait clairement comme une population appartenant à la lignée Ouest-méditerranéenne.

Avec l'ADN mitochondrial, aucune trace d'importation n'a été détectée sur l'Ile que cela soit avec l'échantillonnage réalisé en 2008 ou celui plus récent réalisé en 2017. Malgré l'installation sur l'Ile d'un nombre important de colonies d'origine caucasienne, l'échantillonnage réalisé en 2008 après que ces colonies aient été éliminées de l'Ile, ne montre aucune trace maternelle de ces importations. Il ne semble donc pas que les colonies importées sur l'Ile ait laissé des descendantes une fois que celle-ci ont été éliminées. La diversité haplotypique observée sur l'Ile est inférieure à celle observée pour les populations continentales (même quand celles-ci sont peu introgressées). Cette faible diversité haplotypique est probablement le reflet de cette population insulaire qui a du être colonisée par effet de fondation à partir du continent. La même situation est observée pour l'Ile d'Ouessant dont la population a été installée à partir d'un faible nombre de colonies provenant du continent. Cependant, la population d'abeilles de Groix présente un haplotype mitochondrial propre et qui permet de caractériser un endémisme puisque l'haplotype M32' n'a jusqu'ici été observé que cette l'Ile.

Avec les marqueurs nucléaires la population de l'Ile de Groix fait partie des populations les plus pures en abeilles noires. Le niveau d'hybridation en 2017 est passé en dessous de celui de l'Ile d'Ouessant qui était jusqu'alors la référence de pureté pour *A.mellifera mellifera*. La diversité génétique de la population montre un niveau d'hétérozygotie de 0,333, ce qui est inférieur au niveau de diversité de populations continentales (ie Valenciennes = 0,424), mais elle est supérieure à celle observée sur l'Ile d'Ouessant (0,307).

Bien que l'on n'ait pas observé d'haplotypes mitochondriaux d'origine importé, l'analyse des marqueurs nucléaire montre que parmi les 100 abeilles analysées en 2008, 5 ont des niveaux d'hybridation compris entre 25% et 46%. L'analyse en coordonnées principale (ACP) vient confirmer cette observation puisque ces 5 abeilles apparaissent clairement en position intermédiaire entre les abeilles pures de la lignée M et celles de la lignée C (position des hybrides dans le graphique). L'introduction d'abeilles allochtone sur l'Ile, même si ces colonies ne sont pas restées longtemps à donc eu une influence sur la population locale. Les colonies sont donc restées suffisamment longtemps pour des males issus des colonies importées aient fécondé des reines locales.

L'analyse de l'échantillonnage (2 fois plus important) réalisé en 2017, ne montre pas d'individus ayant des niveaux d'hybridation aussi importants, ce qui est confirmé par l'ACP. La gestion de la crise, liée à l'importation d'un nombre important de colonies allochtone (probablement d'abeilles du caucase), par les apiculteurs de l'Ile a donc été particulièrement efficace puisqu'il ne reste pratiquement plus de trace détectable de cette introduction. Cette gestion a malgré tout entraîné une légère baisse du niveau de diversité de la population locale puisque le niveau d'hétérozygotie de la population est passé de 0,346 en 2008 à 0,333 en 2017.

Aucune colonie ne correspondant pas au standard de l'abeille locale n'a été détectée sur l'Ile et il est donc conseillé aux apiculteurs de continuer à gérer la diversité de leur population comme ils l'ont fait jusqu'à présent. L'haplotype mitochondrial endémique (M32') étant concentré dans le nord de l'ile, il

est conseillé aux apiculteurs d'échanger des souches entre eux afin d'avoir une meilleure distribution de la diversité d'origine maternelle sur l'Ile, ceci afin d'éviter de perdre cet haplotype local.

La population d'abeille de l'Ile de Groix est à l'heure actuelle la plus pure en abeilles noires de notre base de données. Compte tenu de l'augmentation importante des niveaux d'hybridation observés ces dernières années dans un grand nombre de populations continentales, il est essentiel de conserver des populations d'abeilles noires afin de préserver cette sous-espèce patrimoniale en voie de disparition. L'île de Groix constitue un lieu particulièrement propice à la conservation, de part son isolement des autres populations et de part l'apiculture traditionnelle qui y est pratiquée. **Il est donc essentiel de mettre tous les moyens en œuvre pour préserver cet écosystème insulaire fragile, conserver la diversité naturelle observée et soutenir l'action de conservation qui y est pratiquée.**

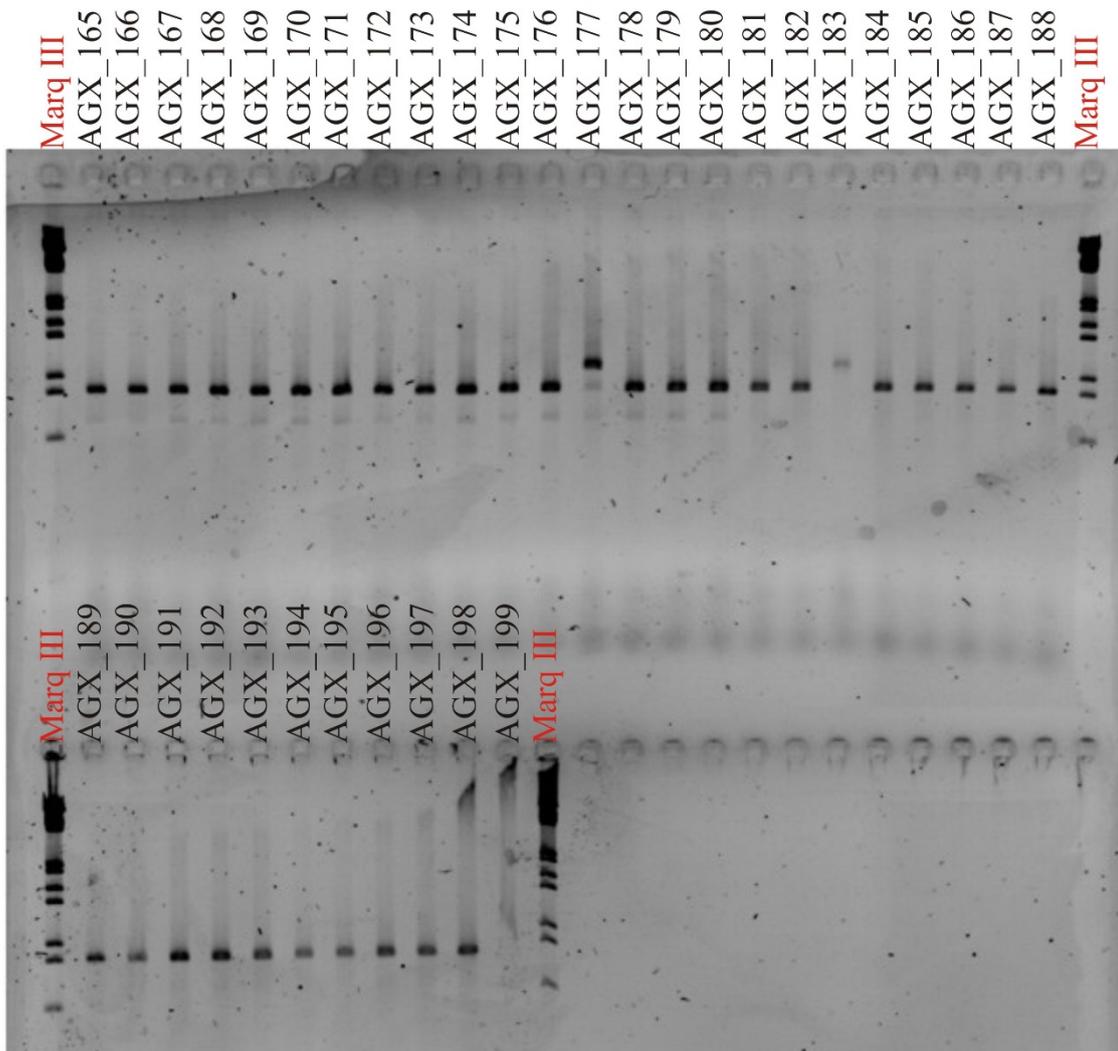
Références bibliographiques

- 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., Gallià 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. Gallià 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 Zuchtauslese, 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. *Mol Ecol 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

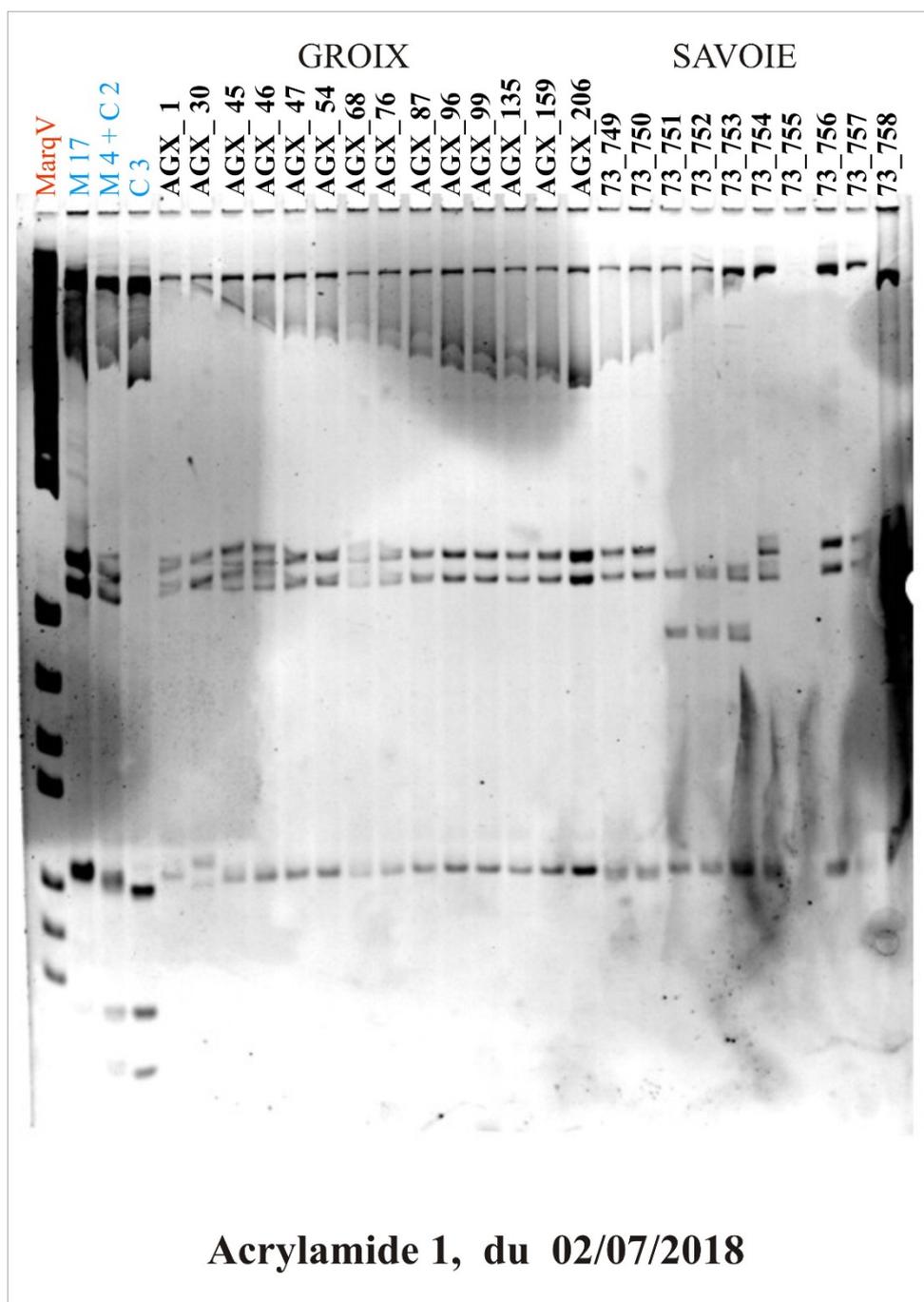
Annexe 1



Gel d'agarose 1,4 % du 01/03/2018
Population Groix 2017

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 (Marq III). Chaque individu correspond à un puits de dépôt (ligne verticale). On distingue sur les gels 2 tailles différentes de produits d'amplification. Le type moyen de structure PQQ (*ie* AGX_165, AGX_166) et un fragment long de structure PQQQ (*ie* AGX_177, AGX_183).

Annexe 2



Annexe 2 : Exemple de profils de migration en gels poly-acrylamides des produits d'amplification de la région intergénique COI-COII après digestion par l'enzyme *Dra* I. Chaque gel comporte un marqueur de taille (**MarqV**) et des témoins dont le profil est connu **M17**, et **M4+C2** et **C3**. La plupart des haplotypes de Groix sont de type M 4, et l'échantillon AGX_30 présente l'haplotype M32'.

Annexe 3

Résultats totaux obtenus avec le test mitochondrial pour chacun des individus de l'étude. La première colonne correspond au n° 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. ND = non déterminé.

Individu	Long.	Haplo.		Individu	Long.	Haplo.	
AGX_1	PQQ	M 4		AGX_31	PQQQ	M 32'	
AGX_2	PQQ	M 4		AGX_32	PQQQ	M 32'	
AGX_3	PQQ	M 4		AGX_33	PQQQ	M 32'	
AGX_4	PQQ	M 4		AGX_34	PQQQ	M 32'	
AGX_5	PQ	M 6		AGX_35	PQQQ	M 32'	
AGX_6	PQQ	M 4		AGX_36	PQQ	M 4	
AGX_7	PQQ	M 4		AGX_37	PQQ	M 4	
AGX_8	PQQ	M 4		AGX_38	PQQ	M 4	
AGX_9	PQQ	M 4		AGX_39	PQQ	M 4	
AGX_10	PQQ	M 4		AGX_40	PQQ	M 4	
AGX_11	PQQ	M 4		AGX_41	PQQ	M 4	
AGX_12	PQQ	M 4		AGX_42	PQQ	M 4	
AGX_13	PQQ	M 4		AGX_43	PQQ	M 4	
AGX_14	PQQ	M 4		AGX_44	PQQ	M 4	
AGX_15	PQQ	M 4		AGX_45	PQQ	M 4	
AGX_16	PQQ	M 4		AGX_46	PQQ	M 4	
AGX_17	PQQ	M 4		AGX_47	PQQ	M 4	
AGX_18	PQQ	M 4		AGX_48	PQQ	M 4	
AGX_19	PQQ	M 4		AGX_49	PQQ	M 4	
AGX_20	PQQ	M 4		AGX_50	PQQ	M 4	
AGX_21	PQQ	M 4		AGX_51	PQ	M 6	
AGX_22	PQQ	M 4		AGX_52	PQQ	M 4	
AGX_23	PQQ	M 4		AGX_53	PQQ	M 4	
AGX_24	PQQ	M 4		AGX_54	PQQ	M 4	
AGX_25	PQQ	M 4		AGX_55	PQQ	M 4	
AGX_26	PQQQ	M 32'		AGX_56	PQQ	M 4	
AGX_27	PQQ	M 4		AGX_57	PQQ	M 4	
AGX_28	PQQ	M 4		AGX_58	PQQ	M 4	
AGX_29	PQQ	M 4		AGX_59	PQQ	M 4	
AGX_30	PQQQ	M 32'		AGX_60	PQQ	M 4	

Individu	Long.	Haplo.		Individu	Long.	Haplo.	
AGX_61	PQQ	M 4		AGX_106	PQQ	M 4	
AGX_62	PQQ	M 4		AGX_107	PQQ	M 4	
AGX_63	PQQ	M 4		AGX_108	PQQ	M 4	
AGX_64	PQQ	M 4		AGX_109	PQQ	M 4	
AGX_65	PQQ	M 4		AGX_110	PQQ	M 4	
AGX_66	PQQ	M 4		AGX_111	PQQ	M 4	
AGX_67	PQQ	M 4		AGX_112	PQQ	M 4	
AGX_68	PQQ	M 4		AGX_113	PQQ	M 4	
AGX_69	PQQ	M 4		AGX_114	PQQ	M 4	
AGX_70	PQQ	M 4		AGX_115	PQQ	M 4	
AGX_71	PQQ	M 4		AGX_116	PQQ	M 4	
AGX_72	PQQ	M 4		AGX_117	PQQ	M 4	
AGX_73	PQQ	M 4		AGX_118	PQQ	M 4	
AGX_74	PQQ	M 4		AGX_119	PQQ	M 4	
AGX_75	PQQ	M 4		AGX_120	PQQ	M 4	
AGX_76	PQQ	M 4		AGX_121	PQQ	M 4	
AGX_77	PQQ	M 4		AGX_122	PQQ	M 4	
AGX_78	PQQ	M 4		AGX_123	PQQ	M 4	
AGX_79	PQQ	M 4		AGX_124	PQQ	M 4	
AGX_80	PQQ	M 4		AGX_125	PQQ	M 4	
AGX_81	PQQQ	M 32'		AGX_126	PQQ	M 4	
AGX_82	PQQ	M 51		AGX_127	PQQ	M 4	
AGX_83	PQQ	M 4		AGX_128	PQQ	M 4	
AGX_84	PQQ	M 4		AGX_129	PQQ	M 4	
AGX_85	PQQ	M 51		AGX_130	PQQ	M 4	
AGX_86	PQQ	M 4		AGX_131	PQQ	M 4	
AGX_87	PQQ	M 4		AGX_132	PQQ	M 4	
AGX_88	PQQ	M 4		AGX_133	PQQ	M 4	
AGX_89	PQQ	M 4		AGX_134	PQQ	M 4	
AGX_90	PQQ	M 4		AGX_135	PQQ	M 4	
AGX_91	PQQ	M 4		AGX_136	PQQ	M 4	
AGX_92	PQQ	M 4		AGX_137	PQQ	M 4	
AGX_93	PQQ	M 4		AGX_138	PQQQ	M 4'	
AGX_94	PQQ	M 4		AGX_139	PQQ	M 4	
AGX_95	PQQ	M 4		AGX_140	PQQ	M 4	
AGX_96	PQQ	M 4		AGX_141	PQQ	M 4	
AGX_97	PQQ	M 4		AGX_142	PQQ	M 4	
AGX_98	PQQ	M 4		AGX_143	PQQ	M 4	
AGX_99	PQQ	M 4		AGX_144	PQQ	M 4	
AGX_100	PQQ	M 4		AGX_145	PQQ	M 4	
AGX_101	PQQ	M 4		AGX_146	PQQ	M 4	
AGX_102	PQQ	M 4		AGX_147	PQQ	M 4	
AGX_103	PQQ	M 4		AGX_148	PQQ	M 4	
AGX_104	PQQ	M 4		AGX_149	PQQ	M 4	
AGX_105	PQQ	M 4		AGX_150	PQQ	M 4	

Individu	Long.	Haplo.		Individu	Long.	Haplo.	
AGX_151	PQQ	M 4		AGX_180	PQQ	M 4	
AGX_152	PQQ	M 4		AGX_181	PQQ	M 4	
AGX_153	PQQ	M 4		AGX_182	PQQ	M 4	
AGX_154	PQQ	M 4		AGX_183	PQQQ	M 32'	
AGX_155	PQQ	M 4		AGX_184	PQQ	M 4	
AGX_156	PQQ	M 4		AGX_185	PQQ	M 4	
AGX_157	PQQ	M 4		AGX_186	PQQ	M 4	
AGX_158	PQQ	M 4		AGX_187	PQQ	M 4	
AGX_159	PQQ	M 4		AGX_188	PQQ	M 4	
AGX_160	PQQ	M 4		AGX_189	PQQ	M 4	
AGX_161	PQQ	M 4		AGX_190	PQQ	M 4	
AGX_162	PQQ	M 4		AGX_191	PQQ	M 4	
AGX_163	PQQ	M 4		AGX_192	PQQ	M 4	
AGX_164	PQQ	M 4		AGX_193	PQQ	M 4	
AGX_165	PQQ	M 4		AGX_194	PQQ	M 4	
AGX_166	PQQ	M 4		AGX_195	PQQ	M 4	
AGX_167	PQQ	M 4		AGX_196	PQQ	M 4	
AGX_168	PQQ	M 4		AGX_197	PQQ	M 4	
AGX_169	PQQ	M 4		AGX_198	PQQ	M 4	
AGX_170	PQQ	M 4		AGX_199	PQQ	M 4	
AGX_171	PQQ	M 4		AGX_200	PQQ	M 4	
AGX_172	PQQ	M 4		AGX_201	PQQ	M 4	
AGX_173	PQQ	M 4		AGX_202	PQQ	M 4	
AGX_174	PQQ	M 4		AGX_203	PQQ	M 4	
AGX_175	PQQ	M 4		AGX_204	PQQ	M 4	
AGX_176	PQQ	M 4		AGX_205	PQQ	M 4	
AGX_177	PQQQ	M 32'		AGX_206	PQQ	M 4	
AGX_178	PQQ	M 4		AGX_207	PQQ	M 4	
AGX_179	PQQ	M 4		AGX_208	PQQ	M 4	

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 suivantes correspondent aux probabilités d'appartenance de chaque individu à une la race mellifera selon les méthodes fréquentielle (colonnes 3 et 4) et bayésienne (colonnes 5 et 6). Pour ces deux derniers tests, les deux colonnes indiquent respectivement le classement de rang 1 et sa probabilité de classement.

individu	all. Diag.	Freq		Bay	
	% Hybrid.	rang	score	rang	score
		1	%	1	%
AGX_1	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_2	0,05	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_3	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_4	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_5	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_6	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_7	0,05	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_8	0,05	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_9	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_10	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_11	0,05	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_12	0,05	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_13	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_14	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_15	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_16	0,05	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_17	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_18	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_19	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_20	0,05	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_21	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_22	0,05	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_23	0,05	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_24	0,09	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_25	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_26	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_27	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_28	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_29	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_30	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00

individu	all. Diag.	Freq		Bay	
	% Hybrid.	rang	score	rang	score
		1	%	1	%
AGX_31	0,09	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_32	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_33	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_34	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_35	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_36	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_37	0,05	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_38	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_39	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_40	0,05	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_41	0,05	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_42	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_43	0,05	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_44	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_45	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_46	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_47	0,05	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_48	0,05	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_49	0,05	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_50	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_51	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_52	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_53	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_54	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_55	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_56	0,09	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_57	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_58	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_59	0,05	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_60	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_61	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_62	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_63	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_64	0,05	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_65	0,05	mellifera	100,00	mellifera	100,00

individu	all. Diag.	Freq		Bay	
	% Hybrid.	rang	score	rang	score
		1	%	1	%
AGX_66	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_67	0,05	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_68	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_69	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_70	0,05	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_71	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_72	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_73	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_74	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_75	0,05	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_76	0,05	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_77	0,18	mellifera	99,97	mellifera	100,00
AGX_78	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_79	0,05	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_80	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_81	0,05	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_82	0,09	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_83	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_84	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_85	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_86	0,05	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_87	0,05	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_88	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_89	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_90	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_91	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_92	0,05	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_93	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_94	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_95	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_96	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_97	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_98	0,05	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_99	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_100	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00

individu	all. Diag.	Freq		Bay	
	% Hybrid.	rang	score	rang	score
		1	%	1	%
AGX_101	0,09	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_102	0,05	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_103	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_104	0,05	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_105	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_106	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_107	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_108	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_109	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_110	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_111	0,05	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_112	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_113	0,05	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_114	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_115	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_116	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_117	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_118	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_119	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_120	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_121	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_122	0,05	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_123	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_124	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_125	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_126	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_127	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_128	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_129	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_130	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_131	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_132	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_133	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_134	0,05	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_135	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00

individu	all. Diag.	Freq		Bay	
	% Hybrid.	rang	score	rang	score
		1	%	1	%
AGX_136	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_137	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_138	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_139	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_140	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_141	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_142	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_143	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_144	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_145	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_146	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_147	0,05	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_148	0,09	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_149	0,05	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_150	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_151	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_152	0,05	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_153	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_154	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_155	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_156	0,05	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_157	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_158	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_159	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_160	0,05	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_161	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_162	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_163	0,05	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_164	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_165	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_166	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_167	0,05	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_168	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_169	0,05	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_170	0,05	mellifera	100,00	mellifera	100,00

individu	all. Diag.	Freq		Bay	
	% Hybrid.	rang	score	rang	score
		1	%	1	%
AGX_171	0,05	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_172	0,05	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_173	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_174	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_175	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_176	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_177	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_178	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_179	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_180	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_181	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_182	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_183	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_184	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_185	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_186	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_187	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_188	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_189	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_190	0,05	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_191	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_192	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_193	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_194	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_195	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_196	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_197	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_198	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_199	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_200	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_201	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_202	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_203	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_204	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_205	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_206	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_207	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00
AGX_208	0,00	mellifera	100,00	mellifera	100,00