HAL
open science

Diversité génétique et phylogéographie de l'abeille Apis mellifera dans les îles du sud-ouest de l'océan Indien

Maéva Angélique Techer

To cite this version:

Maéva Angélique Techer. Diversité génétique et phylogéographie de l'abeille Apis mellifera dans les îles du sud-ouest de l'océan Indien. Biologie animale. Université de la Réunion, 2015. Français. NNT : 2015LARE0033 . tel-01668521

HAL Id: tel-01668521

https://theses.hal.science/tel-01668521

Submitted on 20 Dec 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ DE LA RÉUNION
Faculté des Sciences et Technologies
Ecole Doctorale Sciences, Technologies et Santé (EDSTS-542)

UMR PVBMT Peuplement Végétaux et Bioagresseurs en Milieu Tropical
CIRAD – Université de La Réunion

THESE

Présentée à l'Université de La Réunion pour obtenir le

DIPLOME DE DOCTORAT EN SCIENCES

Discipline : Biologie des Populations

Diversité génétique et phylogéographie de l'abeille *Apis mellifera* dans les îles du Sud-Ouest de l'océan Indien

Par

Maéva Angélique TECHER

Soutenue publiquement le 20 Novembre à l'Université de La Réunion, Amphi 500, devant le jury suivant :

Dominique STRASBERG, Professeur, Université de La Réunion	**Président du Jury**
Lounès CHIKHI, Directeur de Recherche, HDR, CNRS, Toulouse	**Rapporteur**
Alain VIGNAL, Directeur de Recherche, INRA, Toulouse	**Rapporteur**
Lionel GARNERY, Maître de conférences, UVSQ	**Examinateur**
Bernard Reynaud, Professeur, Université de La Réunion	**Directeur de thèse**

Encadrement de thèse

Johanna CLEMENCET, Maître de conférences, Université de la Réunion	**Encadrante de thèse**
Hélène DELATTE, Chercheur, HDR, CIRAD, La Réunion	**Encadrante de thèse**

Remerciements

Cette thèse est une aventure que j'ai eu le bonheur de vivre en compagnie de nombreuses personnes qui m'ont guidé, financé, enseigné ou encore soutenu jusqu'au bout et que je souhaite sincèrement remercier.

Je tiens en premier lieu à remercier mon directeur de thèse Bernard Reynaud et mes co-encadrantes Hélène Delatte et Johanna Clémencet pour m'avoir donné la chance d'accomplir cette thèse dans les meilleures conditions possibles. Grâce à vous trois, j'ai pu réaliser mon rêve de faire de la recherche dans un domaine qui me passionne. Je remercie Bernard de son accompagnement tout au long de la thèse et d'avoir pu se libérer pour tous les évènements importants malgré son emploi du temps surchargé. Je remercie chaleureusement Hélène pour sa disponibilité à toute épreuve et son acharnement à m'enseigner les principes de génétique des populations, à analyser les données et à rédiger. Merci pour ta gentillesse, ta bienveillance et pour tous les bons moments passés ensemble. Je remercie sincèrement Johanna pour sa rigueur, ses enseignements, sa disponibilité inconditionnelle qui s'est traduite par de ne nombreux aller-retours St Denis-St Pierre pour quelques heures de réunion-corrections-conseils et pour les chouettes échanges malgré toute sa charge de cours. Merci pour tes énigmes qui depuis mon master m'ont amené à réfléchir (causant quelque fois des bugs de cerveau), à renforcer ma curiosité scientifique et d'avoir été l'une des premières à m'orienter pour ensuite me donner l'opportunité de travailler avec vous. Merci à toutes les deux pour votre soutien et de m'avoir laissé une autonomie que ce soit au labo, sur le terrain, etc. Je pourrais encore en écrire mais je pense que vous pouvez mesurer ma reconnaissance : Bee girls power !

Merci aux membres du jury – Dominique Strasberg, Lounès Chikhi, Alain Vignal, Lionel Garnery – d'avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse et de vous déplacer si loin.

Je remercie l'Université de La Réunion pour mon financement de thèse et pour la qualité de ses formations offertes qui m'ont forgé au cours de ses 8 dernières années. Merci à La Région Réunion, au programme e-PROV, au CIRAD d'avoir participé au financement de mes manips et de mes missions pour la collecte d'échantillons.

Merci à tous les partenaires de La Réunion, Maurice, Rodrigues, Seychelles, Comores et à tous les apiculteurs pour leur implication et leur aide lors de l'échantillonnage dans les îles afin que celui-ci se déroule au mieux. Merci également à Pierre Franck, Yves Leconte, Rémy Baudin, Brice Tocko, Fani Hatjina et Pascal Rousse pour la récolte et l'envoi d'échantillons d'Europe et d'Afrique et à Abdoui Azali pour les échantillons des Comores.

Je remercie toute l'équipe de l'UMR PVBMT de m'avoir accueilli ; en particulier au sein du 3P. Merci à tous les chercheurs avec qui j'ai interagi et qui m'ont donné des pistes notamment Emmanuel Wicker, Pierre lefeuvre et Frédéric Chriroleu. Un merci tout spécial à Laurence Humeau pour m'avoir donné goût à la génétique des populations, à l'écologie insulaire et pour ses conseils. Je souhaite également remercier Virgine Ravigné d'avoir pris du temps pour m'expliquer clairement et m'apprendre à utiliser le logiciel Diyabc - faisant presque croire que les concepts maths derrières n'étaient pas si compliqués.

Un grand merci à la « bee team » qui m'a largement aidé dans la réalisation de cette thèse. Merci à toi Lulu d'avoir rendu cette thèse si joyeuse, notamment toute la partie labo avec le mixage de l'enfer (ne t'inquiète pas ma revanche de pon-pon-pon reviendra bientôt) et tous les délires de manips dont l'opération mains bleues. Merci ta précieuse aide pour les manips surtout lors du rush avec les « last » échantillons et de la qualité de ton travail. Merci Patrick pour le terrain à Rodrigues et les bonnes anecdotes qui vont avec, ta gentillesse, les connaissances en apiculture que tu m'as apporté ainsi que le bon miel. Merci aussi à Adrien et Thomas. Merci aussi à Nicolas Blot pour avoir partagé ses connaissances sur l'abeille avec moi lors de son séjour.

Il m'est impossible de ne pas remercier toute la clique des « mauvais marmailles » avec qui j'ai eu le plaisir de prendre mon café et même mes repas. Je vous remercie pour tous les moments de rigolade, le coaching constant et de m'avoir intégré dans votre joyeuse bande. Merci à toi Antoine pour tous tes conseils, ton œil d'expert et pour tes illustrations…pas si vilain caractère que ça au final ! Merci Cédric d'avoir été mon dealeur de série et d'avoir supporté toutes mes railleries, mais c'est parce que je t'apprécie beaucoup. Merci Micheline pour ta bonne humeur, tes chouettes histoires et ton soutien. Merci Sylvain-Rondoudou pour ta gentillesse et les bons capuccinos qui reboostaient ! Merci à toi Gérard pour les bons moments et j'espère qu'on pourra faire du terrain ensemble un jour. Merci à toi David pour la légèreté que tu as apporté au club café. Merci à toi Mumu pour les bons moments de rigolades sous le kiosque et nos chouettes discussions. Merci à toutes les personnes que j'ai côtoyé au labo et qui m'ont assisté lors de l'utilisation de certains équipements. Merci également à tout le personnel du 3P que j'ai pu côtoyer que ce soit techniciens, VSC, stagiaires,… Un merci en particulier à Tristan, Cédric L. et Narindra.

Un grand merci à tous les doctorants et jeunes docteurs avec qui j'ai pu partager mon expérience et de bons moments. Merci à Jérémy G. avec qui j'ai beaucoup partagé depuis le M2 notamment les congrès EIR-A et pour sa complicité, courage pour la fin ! Merci à Maud et Oriane pour votre bonne humeur et le chocolat. Vivement que l'on puisse profiter plus en dehors. Merci à Alice, Morguen, Maxime, Sylvia, Stéphanie, Sayuj, Rodolphe, Pauline, Laury.

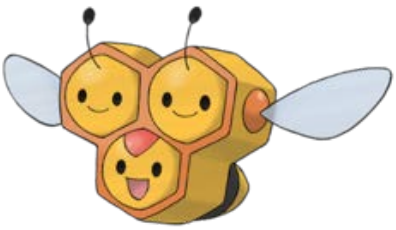
Un merci à mes collègues de bureau Henriette et Brice avec qui le partage de bureau a été tranquille et sympa. Merci Henriette pour les échanges que nous avons pu avoir. Avec l'arrivée d'Olivier j'ai fait deuil de cette tranquillité et le bureau est devenu un lieu de bêtise absolue. Mon très cher véto roux, merci d'avoir illustré mes tableaux et feuilles volantes par des dessins dont toi seul à le secret, d'avoir piraté mon ordi et pour toutes les autres blagues. Mais oui ! Ta superbe extraordinaire bêtise aura mis un peu de piment dans ma dernière année. Merci aussi à Jérémy H. pour les discussions, les vidéos rigolotes et le partage de ton expérience en labo.

Je remercie spécialement mes amis Cathy, Sam, Nicolas, Joëlle, Aurélie, Idriss et Dominique. Merci Cathy d'avoir été mon premier repère et d'avoir continué à m'épauler et me conseiller tout au long de ces années. Merci les « nômes-nômes » pour tout votre soutien et d'avoir toujours été là pour moi. Nicolas, je te remercie infiniment de m'avoir guidé, aidé et du partage de ton expérience lors des blocages.

Les mots ne sont pas suffisants pour exprimer mes remerciements envers mes parents et mon petit frère comme il se doit. Papa, maman vous avez toujours cru en moi, vous m'avez écouté, soutenu et donné toutes les possibilités pour réaliser mes études comme je le souhaitais. Je vous en suis éternellement reconnaissante. En regardant vers le passé, je me rends davantage compte du long chemin parcouru depuis les champs au fin fond de Tras-dos-Monte de nos abos, des cazes à Salazie de papi et mamie jusqu'au doctorat. Merci de m'avoir supporté surtout lorsque j'étais insupportable. Ce travail je vous le dédie.

Enfin je souhaite remercier mon geek préféré d'avoir pris soin de moi et pour ses encouragements. Merci d'avoir essayé de comprendre mes charabias et pour ton soutien tout au long de la thèse. On va enfin pouvoir se faire une vraie partie de Naruto ou de Wow !

Merci à tous



Résumé

Les îles du Sud-Ouest de l'océan Indien (SOOI) abritent une faune et une flore exceptionnelle et constituent l'un des cinq *hotspot* de biodiversité les plus importants au monde. L'abeille domestique *Apis mellifera* occupe divers habitats dans la majorité des îles de cette région. De par sa capacité de pollinisateur généraliste, elle interagit avec une flore indigène et hautement endémique. Elle est également exploitée par l'Homme pour l'apiculture et sa production de miel, pollen et autres produits de la ruche. Au sein du groupe des abeilles (*Apidae)*, *A. mellifera* est un modèle de diversité qui a divergé en plusieurs lignées évolutives et sous-espèces dans son aire d'origine. Parmi les 28 sous-espèces reconnues, *A. m. unicolor* a été décrite comme endémique de Madagascar et appartient à la lignée africaine A. Les populations d'*A. mellifera* des archipels des Mascareignes, Comores et Seychelles, environnant cette île continentale, ont fait l'objet de peu voire pas d'étude.

Les objectifs de cette thèse étaient de caractériser l'abeille dans les archipels des Mascareignes (La Réunion, Maurice, Rodrigues), Comores (Anjouan, Mohéli, Grande Comore, Mayotte) et Seychelles (Mahé, Praslin, La Digue) en identifiant les lignées évolutives et sous-espèces présentes. Dans un second temps, une étude de la diversité et de la structure génétique a été réalisée sur ces mêmes populations insulaires. Pour cela, un large échantillonnage (n = 4095 colonies dans le SOOI, et 238 dans l'aire naturelle continentale) a été couplé à des analyses moléculaires utilisant des marqueurs mitochondriaux (séquençage de la région intergénique COI-COII et du gène ND2) et nucléaires (15 loci microsatellites).

Trois des quatre lignées évolutives (A, C et M) ont été détectées dans les 10 îles étudiées et ce en différentes proportions. La lignée africaine A et la sous-espèce *A. m. unicolor* est prépondérante dans le SOOI excepté à Rodrigues uniquement représenté par la lignée européenne C. Dans toutes les îles de l'archipel des Comores et des Seychelles, 100% des colonies échantillonnées appartiennent à la lignée africaine, 95,2% à La Réunion et seulement 54,2% à Maurice. Pour la première fois, la sous-lignée africaine Z a été décrite en dehors de l'Afrique continentale dans deux des îles des Seychelles. De plus, les îles de l'archipel des Comores constitueraient une zone de contact entre la lignée africaine continentale et les populations d'*A. m. unicolor* (lignée africaine insulaire).

La diversité génétique nucléaire est forte dans les archipels du SOOI et, est structurée par îles et archipels. En outre, les populations du SOOI se différencient fortement des populations continentales africaines et européennes. La combinaison des différents marqueurs privilégie l'hypothèse d'une colonisation ancienne et naturelle d'*A. m. unicolor* depuis Madagascar à La Réunion, Maurice et aux Seychelles. De ce fait, ses nombreuses interactions référencées avec la faune et la flore endémique du SOOI pourraient être expliquée par une longue cohabitation en plus de son rôle de pollinisateur généraliste.

Mots-clés : **île, tropical, abeille domestique, *A. m. unicolor*, microsatellite, ADN mitochondrial, goulot d'étranglement, différenciation génétique, populations, indigène**

Genetic diversity and phylogeography of the honeybee *Apis mellifera* in the South West Indian Ocean islands

Abstract

The South West Indian Ocean (SWIO) islands are home to an exceptional flora and fauna and are considered as one the five most important biodiversity hotspots in the world. In most islands of this region, the honeybee *Apis mellifera* occupies diverse habitats. Regarding its ability as a generalist pollinator, honeybee interacts with native and highly endemic flora. Furthermore, this species is used by human for beekeeping as it is able to produce honey, pollen and other hive products. Within the large group of bees (*Apidae*), *A. mellifera* is a model of diversity that has diverged into several lineages and subspecies in its native range. Among the 28 recognized subspecies, *A. m. unicolor* has been described as endemic to Madagascar and belongs to the African A lineage. The Mascarenes, Comoros and Seychelles archipelagos surround this continental island but the *A. mellifera* populations present have been little or never studied.

The aims of this thesis were to characterize the honeybee from the Mascarenes (La Réunion, Mauritius, Rodrigues), Comoros (Anjouan, Mohéli, Grande Comore, Mayotte) and Seychelles (Mahé, Praslin, La Digue) archipelagos by determining the evolutionary lineages and subspecies present. Secondly, a study of genetic diversity and structure were conducted on these same insular populations. For that, a large sampling was carried (n = 4095 colonies from the SWIO, and 238 from native continental areas) and was combined to molecular analyzes using mitochondrial markers (sequencing of the COI-COII intergenic region and ND2 gene) and nuclear markers (15 microsatellite loci).

Three of the four evolutionary lineages (A, C and M) were detected in different proportions in the 10 studied islands. The African A lineage and *A. m. unicolor* subspecies were predominant in the SWIO excepted for Rodrigues exclusively from the European C lineage. All sampled colonies from the Seychelles and Comoros archipelagos belong to the African lineage while in La Réunion the proportion reach 95.2% and only 54.2% in Mauritius. The presence of the Z African sub-lineage has been described for the first time out of Africa in two Seychelles islands. Moreover, Comoros islands may constitute a contact area between the continental African lineage and *A. m. unicolor* populations (insular African lineage).

The SWIO populations show high levels of nuclear genetic diversity and a structuration by island and archipelago. In addition, SWIO populations strongly differentiated from African and European continental populations. The combined results from different molecular markers favor the hypothesis of an ancient and natural colonization from Madagascar to La Réunion, Mauritius and Seychelles islands. Therefore, the previous referenced interactions between the honeybee and the endemic fauna and flora in the SWIO might be explained by a long cohabitation in addition to its generalist pollinator ability.

Keywords: **island, tropical, honeybee, *A. m. unicolor*, microsatellite, mitochondrial DNA, bottleneck, genetic differentiation, populations, indigenous**

POLE RECHERCHE
Ecoles **D**octorales

LETTRE D'ENGAGEMENT DE NON-PLAGIAT

Je, soussignée Maéva, Angélique TECHER en ma qualité de doctorante de l'Université de La Réunion, déclare être consciente que le plagiat est un acte délictueux passible de sanctions disciplinaires. Aussi, dans le respect de la propriété intellectuelle et du droit d'auteur, je m'engage à systématiquement citer mes sources, quelle qu'en soit la forme (textes, images, audiovisuel, internet), dans le cadre de la rédaction de ma thèse et de toute autre production scientifique, sachant que l'établissement est susceptible de soumettre le texte de ma thèse à un logiciel anti-plagiat.

Fait à Saint-Pierre, La Réunion, le 01/12/2015
Signature :

Extrait du Règlement intérieur de l'Université de La Réunion
(validé par le Conseil d'Administration en date du 11 décembre 2014)

Article 9. Protection de la propriété intellectuelle – Faux et usage de faux, contrefaçon, plagiat

L'utilisation des ressources informatiques de l'Université implique le respect de ses droits de propriété intellectuelle ainsi que ceux de ses partenaires et plus généralement, de tous tiers titulaires de tes droits.
En conséquence, chaque utilisateur doit :
- utiliser les logiciels dans les conditions de licences souscrites ;
- ne pas reproduire, copier, diffuser, modifier ou utiliser des logiciels, bases de données, pages Web, textes, images, photographies ou autres créations protégées par le droit d'auteur ou un droit privatif, sans avoir obtenu préalablement l'autorisation des titulaires de ces droits.

La contrefaçon et le faux
Conformément aux dispositions du code de la propriété intellectuelle, toute représentation ou reproduction intégrale ou partielle d'une œuvre de l'esprit faite ans le consentement de son auteur est illicite et constitue un délit pénal.
L'article 444-1 du code pénal dispose : « Constitue un faux toute altération frauduleuse de la vérité, de nature à cause un préjudice et accomplie par quelque moyen que ce soit, dans un écrit ou tout autre support d'expression de la pensée qui a pour objet ou qui peut avoir pour effet d'établir la preuve d'un droit ou d'un fait ayant des conséquences juridiques ».
L'article L335_3 du code de la propriété intellectuelle précise que : « Est également un délit de contrefaçon toute reproduction, représentation ou diffusion, par quelque moyen que ce soit, d'une œuvre de l'esprit en violation des droits de l'auteur, tels qu'ils sont définis et réglementés par la loi. Est également un délit de contrefaçon la violation de l'un des droits de l'auteur d'un logiciel (…) ».

Le plagiat est constitué par la copie, totale ou partielle d'un travail réalisé par autrui, lorsque la source empruntée n'est pas citée, quel que soit le moyen utilisé. Le plagiat constitue une violation du droit d'auteur (au sens des articles L 335-2 et L 335-3 du code de la propriété intellectuelle). Il peut être assimilé à un délit de contrefaçon. C'est aussi une faute disciplinaire, susceptible d'entraîner une sanction.
Les sources et les références utilisées dans le cadre des travaux (préparations, devoirs, mémoires, thèses, rapports de stage…) doivent être clairement citées. Des citations intégrales peuvent figurer dans les documents rendus, si elles sont assorties de leur référence (nom d'auteur, publication, date, éditeur…) et identifiées comme telles par des guillemets ou des italiques.

Les délits de contrefaçon, de plagiat et d'usage de faux peuvent donner lieu à une sanction disciplinaire indépendante de la mise en œuvre de poursuites pénales.

Table des matières

Liste des Figures **4**

Liste des Tables **9**

I) Contexte **11**

1. Introduction générale **13**

2. L'évolution dans les milieux insulaires **15**

2.1. Colonisation des îles océaniques 16

2.2. Syndrome d'insularité 17

2.3. Processus évolutifs et goulot d'étranglement 21

2.4. Contraintes abiotiques et menaces anthropiques de la biodiversité 23

3. Cadre de l'étude : les îles du Sud-Ouest de l'océan Indien **27**

3.1. Formation géologique des îles 27

3.2. Conditions climatiques, topographie et diversité des habitats 31

3.3. *Hotspot* de biodiversité et déforestation 33

3.4. Colonisation des îles du SOOI par l'Homme 39

4. Le modèle d'étude : l'abeille domestique *Apis mellifera* **43**

4.1. Taxonomie et origine d'*A. mellifera* 43

4.2. Détermination et distribution des sous-espèces d'*A. mellifera* 47

4.3. Lignées évolutives et diversité mitochondriale 53

4.4. Systèmes de reproduction et hybridation 61

5. Objectifs de la thèse **64**

II) Chapitre 1 : Diversité des lignées évolutives et sous-espèces d'abeilles dans les îles du Sud-Ouest de l'océan Indien **67**

1. Background **71**

2. Materials and Methods **75**

2.1. Sampling in the SWIO islands 75

2.2. Sampling in the African and European populations 75

2.3. DNA extraction 77

2.4. Amplification and sequencing of the COI-COII intergenic region and ND2 region 77

2.5. Genetic diversity and phylogenetic analyses 79

3. Results **81**

3.1. Evolutionary lineages identification and distribution islands 81

3.2. COI-COII maternal lineages and sequence diversity 85

3.3. African maternal lineages: A_I, A_{III} and Z sub-lineages 85

3.4. European maternal lineages C and M 89

3.5. Phylogeny of the ND2 region 91

4. Discussion **99**

5. Acknowledgements **103**

III) Chapitre 2 : Caractérisation génétique de la population d'abeille (*Apis mellifera*) sur l'île de Rodrigues par l'utilisation de marqueurs microsatellites et mitochondriaux **105**

1. Introduction **108**

2. Materials and Methods **110**

2.1. Sampling and DNA extraction 110

2.2. Mitochondrial DNA analysis 110

2.3. Microsatellite DNA analysis 112

2.4. Testing for a bottleneck event using ABC 114

3. Results **118**

3.1. Mitochondrial DNA 118

3.2. Microsatellite loci 118

3.3. Testing for a bottleneck event using ABC 120

4. Discussion **122**

5. Acknowledgements **125**

IV) Chapitre 3 : Diversité génétique des populations d'abeille (*Apis mellifera* L.) de l'archipel des Seychelles **127**

1. Introduction **131**

2. Materials and Methods **135**

2.1. Honeybee colonies sampling 135

2.2. DNA extraction and mitochondrial analysis 135

2.3. Microsatellite genotyping 137

2.4. Nuclear population genetic and structure analysis 137

3. Results **141**

3.1. Mitochondrial diversity of the COI-COII region 141

3.2. Nuclear microsatellite genetic diversity 143

3.3. Genetic differentiation and population structure 145

5. Conclusion **157**

6. Acknowledgements **158**

V) Chapitre 4 : L'effet île contribue à la différenciation génétique des populations d'*Apis mellifera unicolor* dans les archipels du Sud-Ouest de l'océan Indien **164**

1. Introduction **168**

2. Materials and Methods **170**

2.1. Honeybee populations sampling 170

2.1.1. Sampling in the SWOI islands 172

2.1.2. Sampling in Africa and Europe 174

2.2. DNA extraction and mitochondrial COI-COII analysis 176

2.3. Microsatellite analysis 177

2.4. Population genetic analysis 177

3. Results **178**
3.1. Mitochondrial diversity 178
3.1.1. Structure of the COI-COII intergenic region 178
3.1.2. COI-COII restriction profiles pattern 180
3.1.3. Distribution of mtDNA evolutionary lineages 186
3.2. Nuclear genetic diversity in the SWIO 188
3.3. Population genetic differentiation 190
3.3.1. F_{ST} analysis and Da distance 190
3.3.2. PCA analysis and genetic differentiation 192
3.4. Population structure and genetic clusters 196
3.4.1. Population structure in the Mascarene archipelago 196
3.4.2. Population structure in the continental areas 196
3.4.3. Global populations structure of the SWIO honeybee 200
4. Discussion **205**
5. Conclusion **210**
5. Acknowledgements **211**
VI) Discussion générale et perspectives **214**
Discussion générale **215**
1. Les origines maternelles de l'abeille du SOOI sont majoritairement de lignée évolutive africaine mais divergent de l'Afrique continentale **215**
1.1. Une sous lignée africaine caractéristique des îles du SOOI 215
1.2. Le patron de diversité des séquences COI-COII des populations d'A. m. unicolor indiquent des anciennes colonisations des archipels du SOOI 219
1.3. L'archipel des Comores, un « passage » entre l'Afrique continentale et Madagascar ? 222
1.4. Détection de la sous-lignée africaine Z dans l'archipel des Seychelles et Comores : la distance au continent joue t-elle un rôle ? 225
1.5. Détection d'importations dans l'archipel des Mascareignes 228
2. Structure et diversité génétique nucléaire des populations d'abeilles du SOOI **229**
2.1. Influence de l'Homme dans les îles des Mascareignes (importations et dégradation des habitats) 229
2.2. Une sous-lignée caractéristique de la région SOOI mais plusieurs populations 232
Conclusion et perspectives **236**
Références bibliographiques **240**
Annexe 1 : Curriculum Vitae **270**
Annexe 2 : Article en co-auteur « Genetic diversity of the endemic honeybee: *Apis mellifera unicolor* (Hymenoptera: Apidae) in Madagascar) » **274**
Annexe 3 : Fréquences alléliques des populations du SOOI et de populations continentales d'Afrique et d'Europe (*n* > 5) pour les 14 microsatellites utilisés **299**

Glossaire

Abréviations (entre parenthèses est précisé l'abréviation du terme en anglais)

ACP (PCA)	Analyse en composante principale (*Principal Components Analysis*)
ADN (DNA)	Acide DésoxyriboNucléique
ADNmt (mtDNA)	ADN mitochondrial
ARNt (tRNA)	Acide RiboNucléique de transfert
CCD	Syndrome d'effondrement des colonies (*Colony Collapse Disorder*)
COI-COII	Région intergénique non codante entre les gènes codants pour le cytochrome oxydase I et II
DACP (DAPC)	Analyse discriminante en composante principale (*Discriminant Analysis of Principal Components*)
dNTP	Désoxynucléotides triphosphates libres
DraI	Enzyme de restriction découverte chez *Deinococcus radiophilus*
H_2O	Eau
HWE	Equilibre du modèle d'Hardy-Weinberg
MCMC	Algorithme de Monte Carlo par chaîne de Markov (*Markov Chain Monte Carlo algorithm*)
$MgCl_2$	Chlorure de magnésium
ND2	Gène codant pour la NADH déshydrogénase sous-unité II
PCR	Réaction en chaîne par polymérase (*Polymerase Chain Reaction*)
RFLP	Polymorphisme de longueur des fragments de restriction (*Restriction Fragment Polymorphism Length*)
SNP	Polymorphisme de nucléotide simple (*Single nucleotide polymorphism*)
Sp.	Espèce
Ssp.	Sous-espèce
UMR PVBMT	Unité Mixte de Recherche – Peuplements Végétaux et Bioagresseurs en Milieu Tropical
UV	Ultraviolet

Code île, pays ou région

AFR	Afrique
ANJ	Anjouan (Archipel des Comores)
CAF	République de Centrafrique
CHE	Suisse
DEU	Allemagne
DIG	La Digue (Archipel des Seychelles)
EGY	Egypte
ESP	Espagne
EUR	Europe
FRA	France
GAB	Gabon
GCO	Grande Comore (Archipel des Comores)
GRC	Grèce
ITA	Italie
MAH	Mahé (Archipel des Seychelles)
MDG	Madagascar
MOH	Mohéli (Archipel des Comores)
MOZ	Mozambique
MUS	Maurice (Archipel des Mascareignes)
MYT	Mayotte (Archipel des Comores)
MWI	Malawi
PRA	Praslin (Archipel des Seychelles)
PRT	Portugal
REU	La Réunion (Archipel des Mascareignes)
ROD	Rodrigues (Archipel des Mascareignes)
SEN	Sénégal
SOOI (SWIO)	Sud-Ouest de l'océan Indien
STP	São Tomé et Principe
TZA	Tanzanie
TCD	Tchad

UGA	Ouganda
USA	États-Unis d'Amérique
ZAF	Afrique du Sud
ZWE	Zimbabwe

Unités

°C	Degrés Celsius
km²	Kilomètre carré
MA	Million d'années
min	Minute
mL	Millilitre
pb	Paire de base (nucléotide)
s	Seconde
µL	Microlitre

Paramètres génétiques

$\mathbf{A_{null}}$	Fréquence des allèles nuls
$\mathbf{A_r}$	Richesse allélique
BIC	Critère d'information Bayésien (*Bayesian Information Criterion*)
$\mathbf{F_{IS}}$	Indice de consanguinité
$\mathbf{F_{ST}}$	Indice de différenciation
$\mathbf{H_{exp}}$	Taux d'hétérozygotie attendu sous l'équilibre d'Hardy-Weinberg
$\mathbf{H_{obs}}$	Taux d'hétérozygotie observé
$\boldsymbol{n}$	Taille de l'échantillon
$\mathbf{N_a}$	Nombre d'allèles moyen par locus
$\mathbf{N_e}$	Taille efficace de la population

Liste des Figures

FIGURE I-1 : PHOTOS D'ABEILLE MELLIFERE/DOMESTIQUE BUTINANT DES PLANTES A FLEURS ENDEMIQUES DE LA REUNION DONT LE BOIS DE LAURENT-MARTIN *FORGESIA RACEMOSA* EN (A), LE BOIS PUANT *FOETIDIA MAURITIANA* EN (B), *PSIASIA TEREBINTHINA* INDIGENE DE MAURICE EN (C) (KAISER-BUNBURY *ET AL.*, 2010). 12

FIGURE I-2 : PHOTOS DE COLONIES D'ABEILLES MELLIFERE/DOMESTIQUE DANS DIFFERENTES ILES DU SOOI. 14

FIGURE I-3 : MODELE DE L'EQUILIBRE DE LA THEORIE DE BIOGEOGRAPHIE INSULAIRE SELON MACARTHUR AND WILSON (1967). 18

FIGURE I-4 : REPRESENTATION GRAPHIQUE DE L'EFFET DE GOULOT D'ETRANGLEMENT SUR LA DIVERSITE GENETIQUE ET LES FREQUENCES ALLELIQUES APRES UN EVENEMENT DE COLONISATION OU DE REDUCTION DRASTIQUE DE LA POPULATION. 20

FIGURE I-5 : CARTE DE LA DISTRIBUTION DES POINTS CHAUDS DE LA BIODIVERSITE SELON MYERS *ET AL.* (2000) ET MITTERMEIER *ET AL.* (2011). 22

FIGURE I-6 : DELIMITATION DU POINT CHAUD DE BIODIVERSITE DE MADAGASCAR ET DES ILES DE L'OCEAN INDIEN 22

FIGURE I-7 : CARTE DE LA DISPOSITION ACTUELLE DES ILES DE LA ZONE SUD-OUEST DE L'OCEAN INDIEN AVEC INDICATION DE LEUR AGE GEOLOGIQUE ESTIMEET L'AGE DES PREMIERES COLONISATIONS DURABLES PAR L'HOMME. 26

FIGURE I-8 : RECONSTRUCTIONS DE LA TECTONIQUE DES PLAQUES AU NIVEAU DE L'OCEAN INDIEN DU CRETACE TARDIF AU MIOCENE. 28

FIGURE I-9 : CARTE PRESENTANT LA VARIATION DES NIVEAUX DES OCEANS AU COURS DES TEMPS GEOLOGIQUES DANS LA ZONE SUD-OUEST DE L'OCEAN INDIEN. 30

FIGURE I-10 : CARTE DE LA ZONE SUD-OUEST DE L'OCEAN INDIEN PRESENTANT LA DELIMITATION DES ZONES CLIMATIQUES. 32

FIGURE I-11 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'ETAGEMENT DE LA VEGETATION EN FONCTION DE L'ALTITUDE ET DE L'ORIENTATION AUX ALIZEES. 32

FIGURE I-12 : SCENARIO DE COLONISATION ET DE DIVERSIFICATION DES INSECTES DE L'ORDRE *PHASMATODEA* A LA REUNION ET A MAURICE. 34

FIGURE I-13 : CARTE DE LA DEFORESTATION DE MADAGASCAR ET PRESENTANT L'EVOLUTION DE COUVERTURE FORESTIERE ENTRE 1950 ET 200. 36

FIGURE I-14 : CARTE DE LA REPARTITION DES HABITATS ORIGINAUX A LA REUNION SUITE A LA COLONISATION ET DEGRADATION DES MILIEUX. 38

FIGURE I-15 : EVOLUTION HISTORIQUE DU COUVERT VEGETAL A L'ILE MAURICE. 38

FIGURE I-16 : CARTE DE LA COUVERTURE FORESTIERE DES ILES DE GRANDE COMORE, ANJOUAN ET MOHELI 40

FIGURE I-17 : CARTE DE LA REPARTITION DES ZONES NATURELLES SUR LES TROIS ILES PRINCIPALES DES SEYCHELLES. 42

FIGURE I-18 : MODELE DE L'ETUDE L'ABEILLE DOMESTIQUE, *APIS MELLIFERA*. A GAUCHE, DEUX OUVRIERES BUTINANT DES FLEURS DE *DOMBEYA* ET A DROITE, UNE COLONIE D'ABEILLE AVEC UNE REINE AU CENTRE (LA REUNION). 42

FIGURE I-19 : A) PHYLOGENIE DE LA SOUS-FAMILLE, TRIBU ET GENRE DES ABEILLES *APIDAE*. B) HISTOGRAMME INDIQUANT LE NOMBRE D'ESPECES DECRITES POUR CHAQUE GROUPE. 44

FIGURE I-20 : DIFFERENTS SCENARIOS EVOLUTIFS HYPOTHETIQUES DE L'ORIGINE DE L'ABEILLE *A. MELLIFERA*. 46

FIGURE I-21 : CARTE DE LA DISTRIBUTION GEOGRAPHIQUE DES 28 SOUS-ESPECES RECONNUES D'*A. MELLIFERA* DANS SON AIRE DE REPARTITION NATURELLE AVEC INDICATION DE LA REPARTITION DES LIGNEES EVOLUTIVES A, C, M, O ET DU SOUS-GROUPE Z 50

FIGURE I-22 : PHENOGRAMME TRIDIMENSIONNEL DES BRANCHES EVOLUTIVES D'*A. MELLIFERA* OBTENU APRES ANALYSES DE LA MORPHOMETRIE DE PLUSIEURS SOUS-ESPECES SELON RUTTNER (1988) 54

FIGURE I-23 : ARBRES BASES SUR LES DONNEES SNPS DE WHITFIELD *ET AL.* (2006) CONSTRUITS AVEC LA METHODE NEIGHBOR JOINING AVEC EN B) UN ENRACINEMENT DE L'ARBRE EN AFRIQUE (LIGNEE EVOLUTIVE A) ET EN C) DEUX AUTRES PROPOSITIONS D'ARBRES TRES BIEN SOUTENUS PAR LES BOOTSTRAPS 55

FIGURE I-24 : REPRESENTATION DES RELATIONS GENETIQUES ENTRE DES LIGNEES EVOLUTIVES, SOUS-ESPECES ET POPULATIONS D'ABEILLES (INDIGENES OU INTRODUITES) AVEC UN ARBRE PHYLOGENETIQUE ET DES ANALYSES BAYESIENNES DE *CLUSTERING* (STRUCTURE) SUR LA BASE DE 8,3 MILLIONS DE SNPS 56

FIGURE I-25 : VARIABILITE NUCLEOTIDIQUE AU SEIN DE LA SEQUENCE P CHEZ PLUSIEURS SOUS-ESPECES D'*APIS MELLIFERA*. 56

FIGURE I-26 : EXEMPLE DE VARIABILITE DE DE LA REGION INTERGENIQUE COI-COII DE L'ADN MITOCHONDRIAL CHEZ L'ABEILLE DOMESTIQUE AVEC PROFILS DE RESTRICTION OBTENUS PAR LA PCR-RFLP *DRAI*. 58

FIGURE I-27 : STRUCTURE GENETIQUE DES POPULATIONS DU MOYEN ORIENT (SYRIE, LIBAN, ET IRAQ) DE LA SOUS-LIGNEE Z AU REGARD D'ECHANTILLONS DES LIGNEES EVOLUTIVES A, C, M ET O. 60

FIGURE I-28 : ARBRE PHYLOGENETIQUE NON ENRACINE DES SEQUENCES ND2 BASE SUR LA METHODE NEIBOURG-JOINING CHEZ 14 SOUS-ESPECES DE L'ABEILLE *A. MELLIFERA*. 60

FIGURE I-29 : DIMORPHISME SEXUEL ET DIFFERENCES MORPHOLOGIQUES ENTRE LES TROIS CASTES PRESENTES DANS UNE COLONIE D'ABEILLE *APIS MELLIFERA*. 62

FIGURE I-30 : SCHEMA EXPLIQUANT LA PARENTE AU SEIN DES SOCIETES D'HYMENOPTERES HAPLO-DIPLOÏDE. 62

FIGURE II-1 : MAP OF THE SAMPLING LOCATION AND DISTRIBUTION OF THE DETECTED HONEYBEE EVOLUTIONARY LINEAGES. POPULATIONS WERE SAMPLED IN ISLANDS OF THE SOUTH WEST INDIAN OCEAN, AFRICA AND EUROPE. 74

FIGURE II-2 : MINIMAL SPANNING TREE BASED ON 84 SEQUENCE TYPES OF THE HONEYBEE COI-COII INTERGENIC REGION. 87

FIGURE II-3 : APPROXIMATELY-MAXIMUM-LIKELIHOOD PHYLOGENETIC TREE FROM ALIGNMENT OF PARTIAL ND2 SEQUENCES (610PB) OF *APIS MELLIFERA*. 97

FIGURE III-1 : A) DISTRIBUTION OF THE MITOCHONDRIAL SEQUENCES ON THE 20 SAMPLED SITES OF RODRIGUES. B) DETAILS ON BEEKEEPER APIARIES. 109

FIGURE III-2 : SCHEMATIC DRAWING OF THE 4 SCENARIOS USED FOR THE ABC METHOD. 113

FIGURE IV-1 : DISTRIBUTION OF THE 32 HONEYBEE COLONIES SAMPLING SITES IN THE THREE MAIN AND TARGETED ISLANDS OF THE SEYCHELLES ARCHIPELAGO: MAHÉ, PRASLIN AND LA DIGUE. 134

FIGURE IV-2 : PCAS BASED ON 341 INDIVIDUAL MULTILOCUS GENOTYPES USING R ADEGENET PACKAGE (JOMBART, 2008), IN THE ISLANDS OF THE SEYCHELLES ARCHIPELAGO 146

FIGURE IV-3 : STRUCTURE OF THE NUCLEAR GENETIC DIVERSITY OF THE SEYCHELLIAN SAMPLES AND COMPARISON WITH REFERENCE POPULATIONS BASED ON 14 MICROSATELLITES *LOCI*. 149

FIGURE V-1 : A) GEOGRAPHICAL DISTRIBUTION OF THE HONEYBEE SAMPLING SITES IN AFRICA, EUROPE AND ISLANDS OF THE SOUTH WEST INDIAN OCEAN (SWIO). B) GEOGRAPHICAL DISPOSITION AND LOCALISATION OF THE MASCARENE AND SEYCHELLES ARCHIPELAGO WITH RESPECT TO MADAGASCAR. 173

FIGURE V-2 : RESTRICTION MAPS CORRESPONDING TO THE 19 *DRAI* RESTRICTION PATTERNS OBSERVED ON AGAROSE GEL AND CONFIRMED BY SEQUENCING OF THE COI-COII INTERGENIC REGION.. 179

FIGURE V-3 : NEIGHBOUR-JOINING TREE USING NEI'S DISTANCE (1983) AND COMPUTED FROM 14 *LOCI* MICROSATELLITE DATA OF THE SAMPLED SWIO ISLANDS, AFRICAN AND EUROPEAN COUNTRIES (WITH N ≥ 5). 193

FIGURE V-4 : A) PCAS BASED ON 4005 INDIVIDUAL MULTILOCUS GENOTYPES FROM THE SEVEN STUDIED SOUTH WEST INDIAN OCEAN ISLANDS, USING R ADEGENET PACKAGE (JOMBART 2008) FOR AXIS 1 AND 2. B) PCAS BASED ON 4231 INDIVIDUAL MULTILOCUS GENOTYPES FROM SWIO POPULATIONS, AFRICAN AND EUROPEAN GROUPS FOR AXIS 1 AND 2. 194

FIGURE V-5 : HONEYBEE POPULATION STRUCTURE OF THE SWIO ISLANDS, AFRICAN AND EUROPEAN COLONIES, INFERRED FROM 14 MICROSATELLITES LOCI. 199

FIGURE VI-1 : SYNTHESE DE LA REPARTITION DES LIGNEES EVOLUTIVES A, C ET M ET SOUS-LIGNEES (A_I, A_{III} ET Z) DE L'ABEILLE DANS LES ILES ETUDIEES DU SOOI ET POPULATIONS CONTINENTALES D'AFRIQUE ET D'EUROPE ANALYSEES AVEC LE MARQUEUR COI-COII. 217

FIGURE VI-3 : REVISION DE LA CARTE DE DISTRIBUTION GEOGRAPHIQUE NATURELLE DES LIGNEES EVOLUTIVES A, C, M, O, DE LA SOUS-LIGNEE Z ET DES 28 SOUS-ESPECES RECONNUES DE L'ABEILLE MELLIFERE AVEC L'EXTENSION DE L'AIRE DE REPARTITION NATURELLE D'*A. M. UNICOLOR* INCLUANT LES ARCHIPELS DU SOOI. 220

FIGURE VI-4 : HISTOIRE GEOGRAPHIQUE DES ABEILLES PAR RAPPORT AUX DECOUVERTES DE FOSSILES D'ABEILLES (ETOILE) ET POSSIBLES ROUTES DE MIGRATION DES ABEILLES DU GENRE *APIS* DURANT L'OLIGOCENE, MIOCENE, QUATERNAIRE ET DISTRIBUTION ACTUELLE. 224

FIGURE VI-5 : CARTE PRESENTANT I) LA DERIVE VERS LE NORD DE L'AFRIQUE ET DE MADAGASCAR DURANT LE PALEOCENE (60 MA), OLIGOCENE (30 MA) PAR RAPPORT A LEUR POSITION ACTUELLE (0 MA) ET II) LES TRAJECTOIRES DES CYCLONES PENDANT LA PERIODE DE 2005 A 2009, MONTRANT L'INFLUENCE POTENTIELLE DES TEMPETES TROPICALES AIDANT A LA DISPERSION TRANSOCEANIQUE DES ESPECES AFRICAINES VERS LE SOOI. 227

FIGURE VI-6 : RESEAU DE POLLINISATION ENTRE LES INSECTES HYMENOPTERES POLLINISATEURS ET LES PLANTES INDIGENES ET/OU ENDEMIQUES (EN NOIR), EXOTIQUES (EN ROUGE) EN MILIEU RESTAURE ET DEGRADE DE L'ILE MAURICE. 231

FIGURE VI-7 : EXEMPLES DE VARIABILITES GENOMIQUES ET SITES SNPS ENTRE LES LIGNEES EVOLUTIVES A, C ET M D'ABEILLE *A. MELLIFERA* IMPLIQUANT LES GENES A) DU RECEPTEUR DE LA VITELLOGENINE ET EN B) IMMUNITAIRE *HML*. *SOURCE* : MODIFIE DE WALLBERG *ET AL.* (2014) 239

FIGURES SUPPLEMENTAIRES

FIGURE II-S1 : MAP OF THE 83 SAMPLING SITES (PURPLE CIRCLE) IN LA RÉUNION AND DISTRIBUTION OF THE 10 DETECTED SEQUENCES OF THE COI-COII INTERGENIC REGION..... 88

FIGURE II-S2 : MAP OF THE 24 SAMPLING SITES (PURPLE CIRCLE) IN MAURITIUS AND DISTRIBUTION OF THE 8 DETECTED SEQUENCES OF THE COI-COII INTERGENIC REGION. 90

FIGURE III-S1 : BOX WITH DESCRIPTION OF THE METHOD USED FOR DIYABC SOFTWARE WITH PRELIMINARY PCA OF 10 000 SIMULATED DATA SETS FOR EACH SCENARIO AND LOGISTIC REGRESSION OF POSTERIOR PROBABILITIES PER SCENARIO. 117

FIGURE III-S2 : SAMPLING EFFORT REPRESENTED BY THE CUMULATIVE NUMBER OF COLONIES SAMPLED (ORDERED BY SAMPLING DATE) AND MEAN NUMBER OF ALLELES PER *LOCUS* (± STANDARD DEVIATIONS) 119

FIGURE III-S3 : A) AVERAGE LIKELIHOOD OF RUNS IN STRUCTURE (PRITCHARD *ET AL.*, 2000) L(K) ALONG WITH NUMBER OF K CLUSTERS, B) ΔK, ESTIMATOR OF THE OPTIMAL NUMBER OF CLUSTERS (K) ACCORDING TO EVANNO ET AL. (2005). 121

FIGURE IV-S1 : SAMPLING EFFORT REPRESENTED BY THE CUMULATIVE NUMBER OF COLONIES SAMPLED (ORDERED BY SAMPLING DATE) AND MEAN NUMBER OF ALLELES PER LOCUS FOR 15 MICROSATELLITES *LOCI* (± STANDARD DEVIATIONS). 142

FIGURE IV-S2 : A) STRUCTURE PLOTS (PRITCHARD *ET AL.*, 2000) ASSUMING K = 2 AND 5 FOR THE SEYCHELLIAN SAMPLES, BASED ON 15 MICROSATELLITES *LOCI*. SITES WITHIN ISLANDS ARE SEPARATED BY BLACK LINES AND INDICATED BY THE LEGEND BELOW THE SECOND PLOT. B) AVERAGE LIKELIHOOD OF RUNS IN STRUCTURE L(K) ALONG WITH NUMBER OF K CLUSTERS, C) ΔK, ESTIMATOR OF THE OPTIMAL NUMBER OF CLUSTERS (K) ACCORDING TO EVANNO ET AL. (2005). 150

FIGURE IV-S3 : A) AVERAGE LIKELIHOOD OF RUNS IN STRUCTURE L(K) ALONG WITH NUMBER OF K CLUSTERS BASED ON 14 MICROSATELLITES *LOCI* FOR THE SEYCHELLES AND THE TWO REFERENCE POPULATIONS: MADAGASCAR AND ITALY, B) ΔK, ESTIMATOR OF THE OPTIMAL NUMBER OF CLUSTERS (K) ACCORDING TO EVANNO ET AL. (2005). 150

FIGURE IV-S4 : A) DAPC BASED ON INDIVIDUAL GENOTYPES OF SEYCHELLIAN HONEYBEE SAMPLES (*N* = 185) AND REFERENCE POPULATIONS OF MADAGASCAR (*N* = 107) AND ITALY (*N* = 49) USING 14 COMPARABLE *LOCI*.. 151

FIGURE V-S1 : *FIRST LINE AND FROM LEFT TO RIGHT*: GEOGRAPHICAL POSITIONS OF THE 127 SAMPLING SITES FROM LA RÉUNION, 31 FROM MAURITIUS, AND 20 FROM RODRIGUES IN THE MASCARENE ARCHIPELAGO. *SECOND LINE AND FROM LEFT TO RIGHT*: GEOGRAPHICAL POSITIONS OF THE 81 SAMPLING SITES FROM MADAGASCAR, 43 SITES IN THE SEYCHELLES ARCHIPELAGO WITH 22 SITES FROM MAHÉ, 16 FROM PRASLIN 5 SITES FROM LA DIGUE..... 176

FIGURE V-S2 : SAMPLING EFFORT REPRESENTED BY THE CUMULATIVE NUMBER OF COLONIES SAMPLED (ORDERED BY SAMPLING DATE) AND MEAN NUMBER OF ALLELES PER LOCUS FOR 14 MICROSATELLITES *LOCI* (± STANDARD DEVIATIONS) IN LA RÉUNION (A) AND MAURITIUS (B). 189

FIGURE V-S3 : A) ABSENCE OF POPULATION STRUCTURE IN THE 2050 HONEYBEE COLONIES SAMPLED FROM 127 SITES OF LA RÉUNION, INFERRED FROM 14 MICROSATELLITES LOCI..... 195

FIGURE V-S4 : A) STRUCTURE BAR PLOTS (K = 2 AND 3) FOR THE 367 HONEYBEE COLONIES SAMPLED FROM 31 SITES OF MAURITIUS, INFERRED FROM 14 MICROSATELLITES LOCI. EACH VERTICAL BAR REPRESENTS ONE INDIVIDUAL AND THE HEIGHT OF THE BAR REPRESENTS THE PROBABILITY OF ASSIGNMENT TO A GENETIC CLUSTER (ONE COLOR). SITES ARE SEPARATED BY BLACK LINES AND ARE ORDERED FROM MUS01 TO 31. MATERNAL ORIGIN FOR EACH INDIVIDUAL (EVOLUTIONARY LINEAGE A, C OR M)

DEFINED BY *DRAI* TEST ON THE COI-COII INTERGENIC REGION IS PRESENTED ON THE TOP. B) AVERAGE LIKELIHOOD OF RUNS IN STRUCTURE L(K) ALONG WITH NUMBER OF K CLUSTERS FOR MAURITIUS. C) ΔK, ESTIMATOR OF THE OPTIMAL NUMBER OF CLUSTERS (K) ACCORDING TO EVANNO ET AL. (2005)... 197

FIGURE V-S5 : A) STRUCTURE BAR PLOTS (K = 2 TO 5) FOR THE 226 HONEYBEE COLONIES SAMPLED IN AFRICA AND EUROPE, INFERRED FROM 14 MICROSATELLITES LOCI. EACH VERTICAL LINE REPRESENTS THE ASSIGNMENT POSTERIOR PROBABILITY OF A SINGLE INDIVIDUAL TO ONE OR SEVERAL GENETIC CLUSTERS (ONE COLOR). SITES ARE SEPARATED BY BLACK LINES. MATERNAL ORIGIN FOR EACH INDIVIDUAL (EVOLUTIONARY LINEAGE A, C OR M AND Z SUB-LINEAGE) DEFINED BY PCR-RFLP *DRAI* TEST ON THE COI-COII INTERGENIC REGION IS PRESENTED ON THE TOP. B) AVERAGE LIKELIHOOD OF RUNS IN STRUCTURE L(K) ALONG WITH NUMBER OF K CLUSTERS FOR AFRICAN AND EUROPEAN SITES. C) ΔK, ESTIMATOR OF THE OPTIMAL NUMBER OF CLUSTERS (K) ACCORDING TO EVANNO ET AL. (2005). 198

FIGURE V-S6 : A) AVERAGE LIKELIHOOD OF RUNS IN STRUCTURE L(K) ALONG WITH NUMBER OF K CLUSTERS FOR GLOBAL STRUCTURE (FIGURE V-5). B) ΔK, ESTIMATOR OF THE OPTIMAL NUMBER OF CLUSTERS (K) ACCORDING TO EVANNO ET AL. (2005). 201

FIGURE V-S7 : INSTRUCT BARPLOTS OF HONEYBEE POPULATION STRUCTURE OF THE SWIO ISLANDS, AFRICAN AND EUROPEAN COLONIES, INFERRED FROM 14 MICROSATELLITES LOCI AND BASED ON 4231 HONEYBEES FOR K = 2 TO 6..... 201

FIGURE V-S8 : DAPC ANALYSES RESULTS USING ADEGENET PACKAGE WITH A) *COMPOPLOT* FUNCTION BARPLOTS INDICATING ASSIGNMENT PROBABILITIES TO A GENETIC CLUSTER FOR EACH INDIVIDUAL (ONE BAR) FROM K = 2 TO 8, AND IN B) THE BIC CURVE VALUES ACCORDING TO THE NUMBER OF CLUSTERS. 203

FIGURE V-S9 : SCATTER GRAPHICAL REPRESENTATION OF THE DAPC ANALYSIS ON SWIO AND CONTINENTALS HONEYBEE POPULATIONS FOR K = 3 TO K = 8. 204

Liste des Tables

TABLE I-1 : LISTE DES 28 SOUS-ESPECES D'*APIS MELLIFERA* DECRITES ET VALIDES SUR LA BASE DE CRITERES MORPHOLOGIQUES ET INDICATION DE LEUR APPARTENANCE A UNE LIGNEE EVOLUTIVE (A : AFRICAINES, M ET C : EUROPEENNES ET O : ORIENTALE) OU SOUS-GROUPE Z (SOUS-LIGNEE A) SUR LA BASE DE L'ANALYSE MORPHOMETRIQUE, DE L'ADN MITOCHONDRIAL OU DU GENOME. 48

TABLE II-1 : SAMPLING LOCATION DETAILS FOR SOUTH WEST INDIAN OCEAN ISLANDS, AFRICAN AND EUROPEAN POPULATIONS BY COUNTRIES. 76

TABLE II-2 : COI-COII INTERGENIC REGION SEQUENCE NAME, COMPOSITION, AND LENGTH WITH ASSOCIATED ACCESSION NUMBER (GENBANK) INFORMATION 78

TABLE II-3 : ND2 REGION SEQUENCE NAME (SIZE = 623BP) AND LENGTH WITH ASSOCIATED ACCESSION NUMBER (GENBANK) INFORMATION. 80

TABLE II-4 : DISTRIBUTION AND OCCURRENCE OF THE 84 DESCRIBED COI-COII INTERGENIC REGION SEQUENCES FOR EACH SAMPLED POPULATION.. 82

TABLE II-5 : DISTRIBUTION AND OCCURRENCE OF THE 33 HAPLOTYPES OF THE PARTIAL ND2 GENE FOR EACH SWIO ISLAND. 92

TABLE III-1 : PARAMETER NAMES OF ALL FOUR SCENARIOS USED IN DIYABC SOFTWARE PRIOR VALUES MINIMUM AND MAXIMUM, POSTERIOR PARAMETER ESTIMATE VALUES (MODE AS POINT OF ESTIMATION) AND 95% CONFIDENCE INTERVAL, RELATIVE BIAS AND RELATIVE SQUARE ROOT ERROR. 113

TABLE III-2 : SAMPLING INFORMATION WITH SITE CODE, NUMBER OF COLONIES ($N_{COLONIES}$); MEAN NUMBER OF ALLELES (N_A); OBSERVED HETEROZYGOSITY (H_{OBS}); EXPECTED UNBIASED HETEROZYGOSITY (H_{EXP}); WEIR & COCKERHAM'S (1984) FIXATION INDEX (F_{IS}). 121

TABLE IV-1 : SAMPLING DETAILS WITH ISLAND LOCATION, SITE CODE, TYPE OF COLONY (WILD OR MANAGED), BEEKEEPER AND APIARY ORIGIN, LOCATION NAME AND NUMBER OF COLONY SAMPLED (N_{COLONY}). 136

TABLE IV-2 : MITOCHONDRIAL SEQUENCES DISTRIBUTION AND NUCLEAR GENETIC DIVERSITY INDICES (BASED ON 15 MICROSATELLITES *LOCI*) PER SITE AND ISLAND. 140

TABLE IV-3 : MITOCHONDRIAL AND NUCLEAR GENETIC DIVERSITY INDICES (BASED ON 14 COMPARABLE MICROSATELLITES *LOCI*) FOR THE SEYCHELLES ISLANDS COMPARED TO REFERENCE POPULATIONS OF MADAGASCAR AND ITALY. 142

TABLE IV-4 : A) F_{ST} VALUES PER PAIR OF SITES WITHIN THE SEYCHELLES ARCHIPELAGO (N > 5 INDIVIDUALS, BASED ON 15 MICROSATELLITES *LOCI*). B) F_{ST} VALUES PER PAIR OF ISLANDS AND/OR REFERENCE POPULATIONS BASED ON 14 COMPARABLE MICROSATELLITES *LOCI* 144

TABLE V-1 : SAMPLING LOCATION DETAILS FOR THE ISLANDS OF THE SOUTH WEST INDIAN OCEAN, AFRICAN AND EUROPEAN POPULATIONS. 172

TABLE V-2 : MITOCHONDRIAL COI-COII INTERGENIC REGION DIVERSITY (BASED ON THE 19 *DRAI* RESTRICTION PROFILES OBSERVED) AND NUCLEAR DIVERSITY INDICES FOR EACH OF SWIO, AFRICAN AND EUROPEAN SITES. 181

TABLE V-3 : MITOCHONDRIAL COI-COII INTERGENIC REGION DIVERSITY (BASED ON THE 19 *DRAI* RESTRICTION PROFILES OBSERVED, N = 4096) AND NUCLEAR DIVERSITY INDICES FOR EACH OF SWIO ISLANDS, AFRICAN AND EUROPEAN COUNTRIES (ALL COLONIES POOLED IN ONE POPULATION). 187

TABLE V-4 : F_{ST} PAIR VALUES AMONG SOOI ISLANDS, AFRICAN AND EUROPEAN COUNTRIES POPULATIONS WITH N ≥ 5 BASED ON 14 MICROSATELLITES. 191

TABLES SUPPLEMENTAIRES

TABLE III-S1 : MICROSATELLITE *LOCI* INFORMATION WITH INDICATION OF MULTIPLEX GROUP (MIX 1 TO 4), USED FOR RODRIGUES 111

TABLE IV-S1 : MICROSATELLITE *LOCI* INFORMATION WITH INDICATION OF MULTIPLEX GROUP (MIX 1 TO 4), USED FOR SEYCHELLES ARCHIPELAGO..... 138

TABLE IV-S2: NUCLEOTIDE ALIGNMENT DETAILS AND VARIATIONS AMONG THE SEYCHELLIAN A_I SUB-LINEAGE DETECTED SEQUENCES COMPARED TO HIGHLY SIMILAR A1 SEQUENCES FROM *A. M. UNICOLOR* IN MADAGASCAR AND OTHER SUBSPECIES. 152

TABLE IV-S3: ALLELE FREQUENCIES AT 15 MICROSATELLITES *LOCI* IN THE THREE ISLANDS HONEYBEE POPULATIONS OF THE SEYCHELLES AND FOR THE TWO REFERENCE MALAGASY AND ITALIAN POPULATIONS..... 159

TABLE V-S1 : F_{ST} PAIR VALUES AMONG SITES IN MAURITIUS ISLAND WITH $N \geq 5$ BASED ON 14 MICROSATELLITES. 212

TABLE V-S2 : F_{ST} PAIR VALUES AMONG SITES IN AFRICA AND EUROPE WITH $N \geq 5$ BASED ON 14 MICROSATELLITES. 213

I) Contexte

Abeille mellifère (ouvrières) sur fleur jaune Hypericum lanceolatum (indigène) à La Réunion

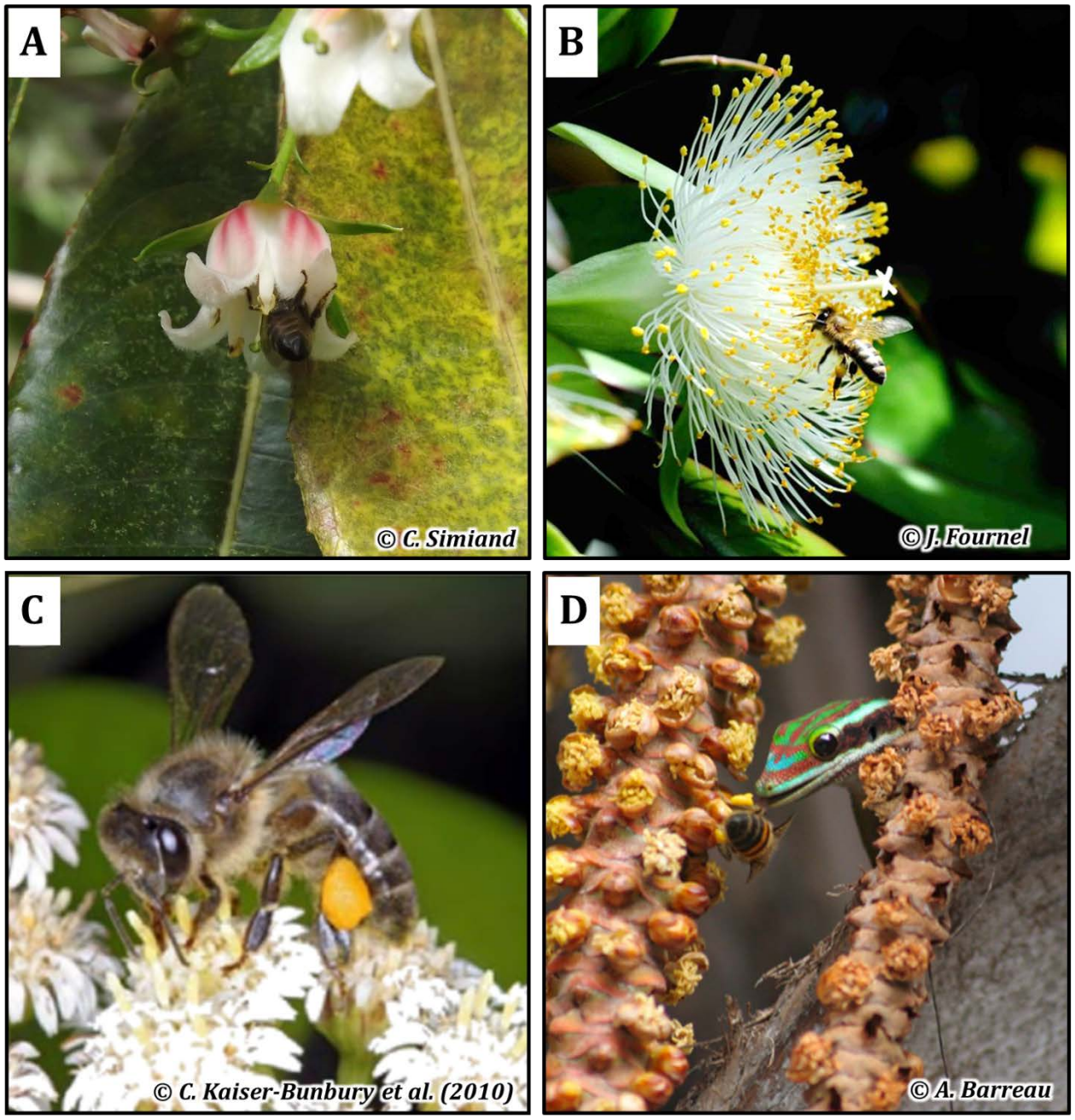


Figure I-1 : Photos d'abeille mellifère/domestique butinant des plantes à fleurs endémiques de La Réunion dont le bois de Laurent-Martin *Forgesia racemosa* en (A), le bois puant *Foetidia mauritiana* en (B), *Psiasia terebinthina* indigène de Maurice en (C) (Kaiser-Bunbury *et al.*, 2010). *Apis mellifera* interagit avec la faune endémique comme dans le cas de cleptoparasitisme avec le gecko de Manapany *Phelsuma inexpectata* (Clémencet *et al.*, 2013).

1. Introduction générale

Les îles tropicales sont des milieux abritant une biodiversité exceptionnelle qui a pu évoluer rapidement de par les pressions environnementales qui y sont exercées. Ce sont des systèmes qui favorisent la spéciation et sont considérés comme des laboratoires naturels pour comprendre les mécanismes évolutifs (Warren *et al.*, 2015). Les îles ont des taux d'endémisme très forts et présentent des espèces particulières et uniques au monde. Les écosystèmes insulaires sont soumis à un équilibre pouvant être brisé par des perturbations exceptionnelles ou anthropiques. Dans ces milieux, certaines espèces sont peu étudiées et leur lien étroit avec l'Homme suscite des interrogations quant à leur origine sur l'île. Les espèces à large distribution et/ou commensales sont souvent considérées comme exotiques à ces milieux. Parmi elles, celles qui interagissent avec la faune et la flore locale nécessitent d'être étudiées comme le cas de l'abeille domestique dans les îles du Sud-Ouest de l'océan Indien (Figure I-1).

L'abeille mellifère ou dite domestique *Apis mellifera* est établie dans toutes les îles du Sud-Ouest de l'océan Indien (Ruttner, 1988, Crane, 1999). En tant qu'insecte pollinisateur, elle a été reportée comme interagissant avec des espèces de plantes à fleurs endémiques aux Seychelles (notamment avec *Deckenia nobilis*, *Phoenicophorium borsigianum*, *Nephrosperma vanhoutteana* et *Medusagyne oppositifolia*) (Kaiser-Bunbury *et al.*, 2011, Finger *et al.*, 2011), à Maurice (notamment avec *Sideroxylon cinereum*, *S. puburulum* et *Dombeya sevathianii*) (Le Péchon *et al.*, 2011, Hansen *et al.*, 2002) et à La Réunion (notamment avec *Gaertnera vaginata, Hugonia serrata, Trochetia granulata*) (Pailler and Thompson, 1997, Le Péchon *et al.*, 2013, Meeus *et al.*, 2011). Elle a aussi été décrite pour interagir avec des espèces animales comme le cas du gecko endémique de La Réunion, *Phelsuma inexpectata,* qui a développé avec elle une interaction cleptoparasite[1] (Clémencet *et al.*, 2013). L'abeille est présente à l'état sauvage dans les écosystèmes naturels et est également exploitée par l'Homme (colonies enruchées Figure I-2).

[1] Ici le gecko vole les pelotes de pollens présentes sur la partie corbeille des pattes de l'abeille

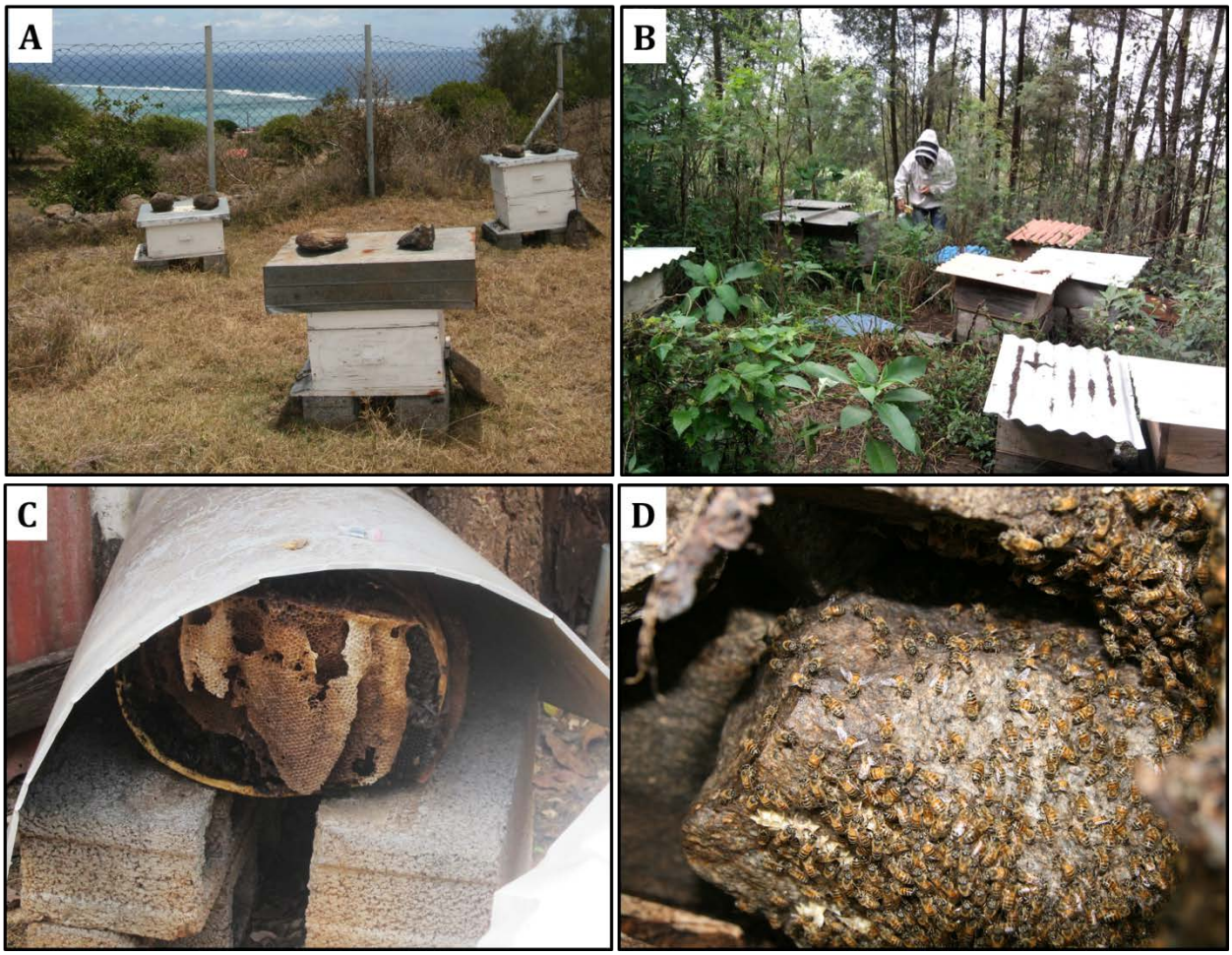


Figure I-2 : Photos de colonies d'abeilles mellifère/domestique dans différentes îles du SOOI. Rucher avec plusieurs colonies exploitées dans des ruches modernes en milieu côtier à Rodrigues en (A), en forêt tropicale humide à La Réunion en (B). En (C) colonie sauvage s'étant installée dans un abri urbain et exploitée par un apiculteur à Maurice. En (D) colonie sauvage non exploitée par l'Homme en milieu naturel à Mahé (Seychelles).

Dans les Mascareignes, l'apiculture est très développée et organisée (Figure I-2). Plus de 20 0000 colonies exploitées ont été identifiées par le Groupement de Défense Sanitaire à La Réunion, environ 2700 à Maurice et 2000 à Rodrigues (Jhumun, 2011, Belmin, 2010). Pour les archipels des Seychelles et des Comores, l'apiculture est très peu professionnalisée et plus traditionnelle, aussi l'effectif des colonies exploitées n'est pas recensé.

La méconnaissance du statut d'*A. mellifera* dans les archipels du SOOI a conduit de nombreux auteurs d'études sur la biologie florale indigène des îles à la considérer comme une espèce exotique. En effet si sa présence avant l'Homme n'est pas clairement définie, des importations d'abeilles européennes pour le développement de l'apiculture locale ont été reportées par le passé dans ces îles (Bappoo and Ramanah, 1989, Schneider, 1989, Cheke, 2010). Pourtant dans la région du SOOI, la sous-espèce *A. m. unicolor* de la lignée africaine a été décrite comme endémique à Madagascar (Latreille, 1804). La présence de cette lignée africaine a été détectée en fin des années 90 dans l'ensemble des colonies testées par Franck *et al.* (2001), mais sur un faible échantillonnage (20 colonies à la Réunion et 10 de Maurice). Toutefois en dehors de cette seule étude, la diversité génétique et la contribution des lignées évolutives dans les populations insulaires d'abeilles du SOOI n'ont pas fait l'objet d'études.

Ainsi, au travers de cette thèse nous proposons une large étude de la diversité et de la structure génétique des populations d'abeilles dans la zone SOOI à l'aide de plusieurs marqueurs moléculaires.

2. L'évolution dans les milieux insulaires

La théorie de l'évolution selon Darwin est considérée comme l'un des fondements de la biologie évolutive. Il propose la théorie selon laquelle les espèces ne sont pas immuables mais évoluent sous la pressions de forces évolutives telles que la sélection naturelle. Les premières esquisses de cette théorie émergent lors de son voyage vers des milieux insulaires. Le célèbre exemple de la radiation adaptative des pinsons de Darwin dans l'archipel des Galápagos constitue l'une de ses nombreuses observations l'ayant aidé à bâtir cette théorie (Darwin, 1859). Parallèlement, dans

l'archipel Malais, Wallace arrivait aux mêmes réflexions quant à l'existence d'une évolution des espèces en mettant l'accent sur les pressions écologiques (Wallace, 1869).

Au cours des deux derniers siècles, la théorie synthétique de l'évolution s'est renforcée avec l'acquisition de nouvelles connaissances et des faits. Le développement de nouvelles disciplines dont la biologie moléculaire et l'épigénétique ont fortement contribué à mieux comprendre les mécanismes évolutifs parmi lesquels l'hérédité génétique. Par ailleurs, l'étude de la biodiversité des îles a continué à jouer un rôle majeur dans la compréhension des processus évolutifs. En effet, les îles arborent souvent des écosystèmes moins complexes en comparaison des milieux continentaux et ce en termes de richesse spécifique, d'interactions biotiques ou encore de connectivité (Pimm, 1984, MacArthur and Wilson, 1967). Aussi les milieux insulaires sont considérés comme des systèmes modèles pour l'étude de l'écologie évolutive (Warren *et al.*, 2015).

2.1. Colonisation des îles océaniques

Les milieux insulaires sont caractérisés comme étant des entités écologiques isolées présentant des habitats contrastant avec ceux environnants (MacArthur and Wilson, 1967).

Les environnements insulaires peuvent être localisés sur la surface continentale au travers d'îles habitats (massifs montagneux, lacs, oasis désertiques,…) ou bien sur la surface océanique. Dans ce deuxième cas, les îles ont été catégorisées en trois groupes : les îles océaniques dites « vraies », les îles continentales et les îles issues de plaque continentale submergée (Whittaker, 1998). Les îles océaniques « vraies » n'ont jamais été connectées aux continents et sont néoformées, soient issues d'un volcanisme de point chaud (ex : La Réunion, Hawaii), de dorsales océaniques (ex : Islande) ou encore de zone de subduction (ex : l'archipel Ryūkyū). Suite à leur émergence océanique, ces îles sont des milieux vierges que les espèces doivent néocoloniser par leurs moyens pour s'y implanter.

A l'inverse, les îles continentales ont été connectées à des communautés continentales puis se sont détachées du continent suite à la tectonique des plaques (Madagascar, Seychelles, Japon). Enfin d'autres îles telles que la Nouvelle-Zélande peuvent être issues de la submersion des continents comme c'est le cas pour Zealandia. Le point commun de ces îles est qu'elles sont toutes isolées des masses continentales et des autres îles par la barrière océanique. Dans un souci de compréhension, le terme île océanique sera utilisé par la suite mais désignera les îles « vraies » néoformées.

Selon la théorie de la biogéographie insulaire, il est prédit que pour une surface équivalente, la richesse spécifique est moins importante sur une île océanique que sur un continent (MacArthur and Wilson, 1967). La colonisation des îles océaniques est contrainte par i) sa distance au continent et/ou à l'île adjacente, ii) sa superficie mais aussi par iii) les capacités de dispersion des espèces (Figure I-3). Le modèle d'équilibre dynamique de MacArthur and Wilson (1967) prédit qu'une île de petite taille offre un espace restreint contraignant l'expansion des populations et est donc soumise à un taux d'extinction plus fort qu'une île de plus grande taille (Figure I-3a). En effet, selon ce modèle à l'équilibre, le taux d'installation de nouvelles espèces colonisatrices devrait être égal au taux d'extinction d'espèces présentes dans le milieu. D'un autre côté, une île proche d'une masse continentale offrira plus d'opportunités de colonisation aux espèces qu'une île plus distante (Figure I-3b).

2.2. Syndrome d'insularité

Suite à la colonisation d'une île océanique, les populations d'espèces établies se retrouvent isolées des populations sources. En raison des contraintes de colonisation des systèmes insulaires et de cet effet d'isolement, l'assemblage des communautés animales et végétales ne constituent qu'un échantillonnage appauvri du pool d'espèces continentales. Ce phénomène est nommé disharmonie des communautés et se traduit par l'absence dans la composition spécifique insulaire de certains groupes ou taxons possédant de faibles capacités de dispersion ou d'espèces spécialistes (Midway and Hodge, 2012, Simberloff, 1974, Cowie and Holland, 2006, Blondel, 1995).

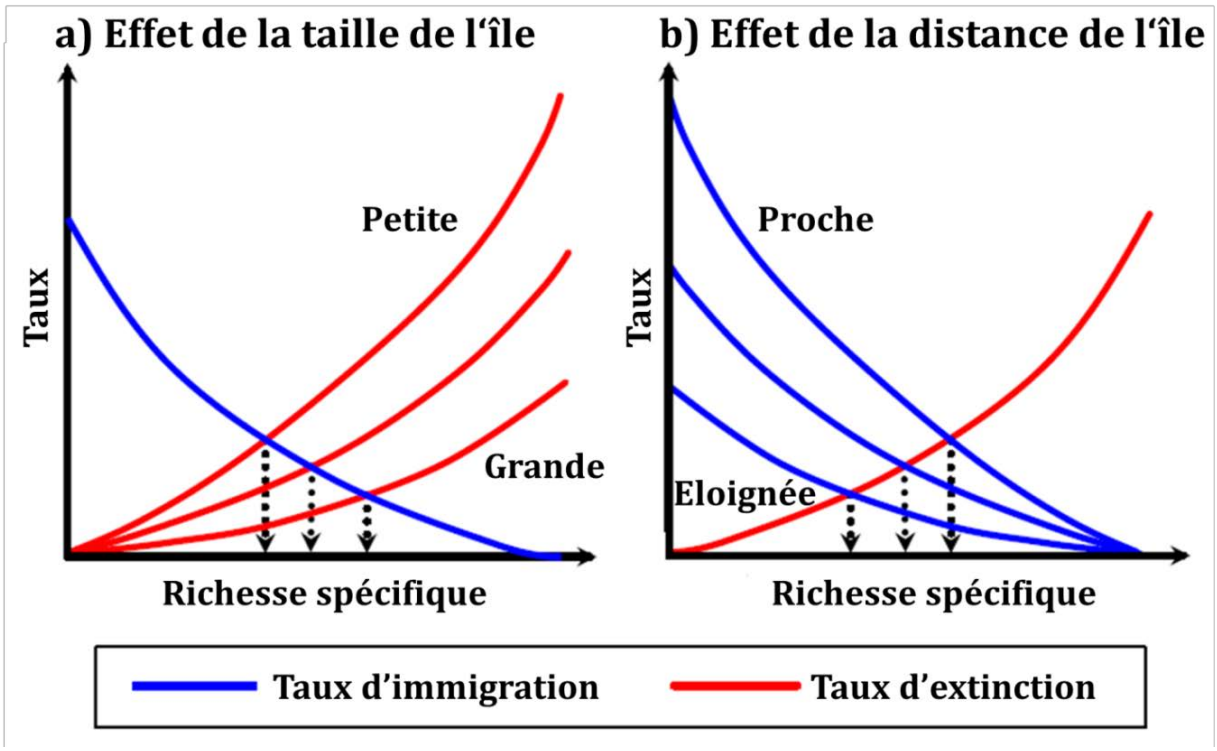


Figure I-3 : Modèle de l'équilibre de la théorie de biogéographie insulaire selon MacArthur and Wilson (1967). a) l'effet de la taille de l'île sur le taux d'extinction et en b) l'effet de la distance de l'île au continent sur le taux de colonisation. L'équilibre en terme de nombre d'espèces est représenté par des flèches en pointillées. *Source :* (Warren *et al.,* 2015).

Les plantes terrestres (à spores ou à graines), les insectes, les oiseaux et les chauves-souris sont les groupes les mieux représentés sur les îles contrairement aux amphibiens et aux mammifères non volants (De Queiroz, 2005). La présence d'un filtre de colonisation se traduit également par l'absence de nombreux prédateurs et parasites.

Par conséquent, les pressions environnementales diffèrent entre les milieux insulaires et continentaux. Dans ces conditions inhérentes aux milieux insulaires, des adaptations écologiques particulières ont été sélectionnées et sont reconnues comme traits du syndrome d'insularité (Blondel, 1986).

Les manifestations de ce syndrome d'insularité sont diverses et comprennent l'élargissement de la niche écologique, les changements morphologiques, les modifications comportementales ou encore les adaptations physiologiques. De nombreux exemples d'expansion de niche écologique en milieu insulaire ont été reportés par la sélection de nouveaux habitats chez certaines espèces d'oiseaux (Prodon *et al.*, 2002), d'araignées (Eberhard, 1989); ou bien par l'exploitation de nouvelles ressources comme le cas des lézards pollinisateurs et consommateurs de nectar (Olesen and Valido, 2003, Le Péchon *et al.*, 2013) ou chez des iguanes marins capables d'ajouter certaines plantes à leur régime alimentaire (Wikelski and Wrege, 2000). D'un point de vue morphologique, le syndrome d'insularité peut se traduire par un gigantisme ou nanisme insulaire (Herridge and Lister, 2012, Meiri *et al.*, 2011) qui peut être dû à l'association de plusieurs facteurs tels que le relâchement des pressions de prédation (Runemark *et al.*, 2014, Michaux *et al.*, 2002) et de compétition (Pafilis *et al.*, 2009) et/ou encore la disponibilité des ressources (Runemark *et al.*, 2015). En ce qui concerne les modifications comportementales, en l'absence de prédateurs certaines espèces ont perdu des comportements défensifs au cours de l'évolution et présentent une « naïveté » insulaire se traduisant par une remarquable docilité (Blumstein and Daniel, 2005). Cette naïveté a été observée chez les iguanes marins des Galápagos, mais face à l'introduction de nouveaux prédateurs certains individus ont présenté des comportements de fuite et des réponses physiologiques de stress qui signaleraient une adaptation inverse sous la réapparition des pressions de la prédation (Berger *et al.*, 2007, Romero and Wikelski, 2010, Rödl *et al.*, 2007).

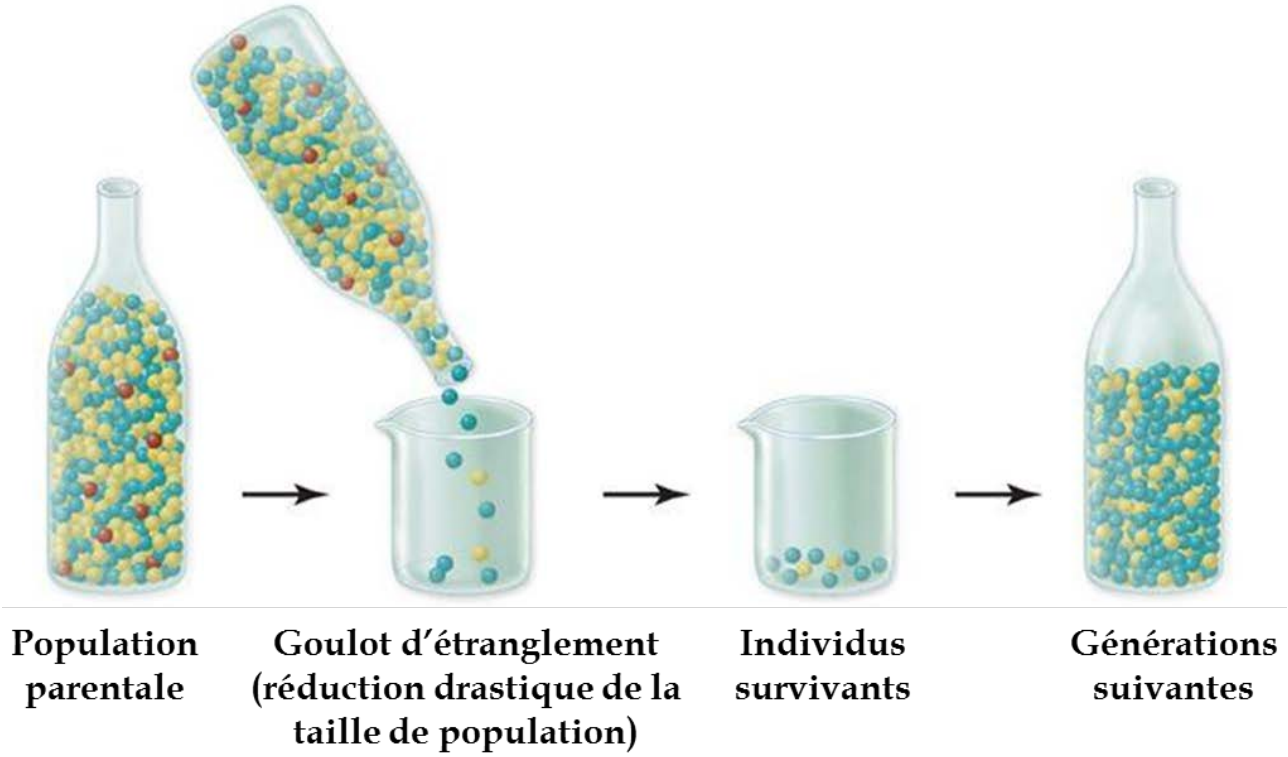


Figure I-4 : Représentation graphique de l'effet de goulot d'étranglement sur la diversité génétique et les fréquences alléliques après un évènement de colonisation ou de réduction drastique de la population. Les allèles (différentes versions d'un même locus génétique) sont représentés par des billes de couleur. *Source :* http://methowconservancy.blogspot.com

2.3. Processus évolutifs et goulot d'étranglement

L'apparition du syndrome d'insularité traduit le fait que les espèces évoluent rapidement suite à la réussite de colonisation d'une île. D'ailleurs, si les îles présentent une richesse spécifique moins importante que les milieux continentaux, le cas inverse est observé pour les taux d'endémisme (Kier *et al.*, 2009).

Selon Emerson (2002), la richesse spécifique des îles peut être le résultat de plusieurs facteurs non exclusifs: i) la mise en place d'une spéciation après effet de goulot d'étranglement ou d'effet de fondation, ii) plusieurs évènements de colonisation d'une île par des sources continentales ou insulaires, iii) une diversification au sein d'une population insulaire par la mise en place d'une barrière abiotique et/ou iv) la radiation adaptative grâce à la disponibilité de niches écologiques très différentes. La radiation évolutive a pu être démontrée dans plusieurs systèmes insulaires et groupes d'êtres vivants, comme avec des plantes à Hawaï (Jorgensen and Olesen, 2001), les pinsons de Darwin aux Galápagos (Tebbich *et al.*, 2010, Grant and Grant, 2002) ou encore chez des lézards *Phelsuma* aux Seychelles (Radtkey, 1996, Austin *et al.*, 2004).

Lors de la colonisation de l'île par des espèces, seule une partie de la diversité génétique de la population d'origine est représentée, on parle alors d'effet de goulot d'étranglement (Figure I-4). Lors de cet évènement, l'effectif des individus colonisateurs n'est pas suffisant pour représenter l'ensemble de la diversité allélique et des allèles rares peuvent être perdus. De ce fait, la diversité génétique des populations insulaires est généralement plus faible que celle de la source continentale (Frankham, 1997). L'isolement géographique des îles océaniques limite le contact et les flux de gènes entre la population source et la population établie dans le milieu insulaire. Les populations insulaires sont constituées de petits effectifs qui sont soumis à une dérive génétique plus forte.

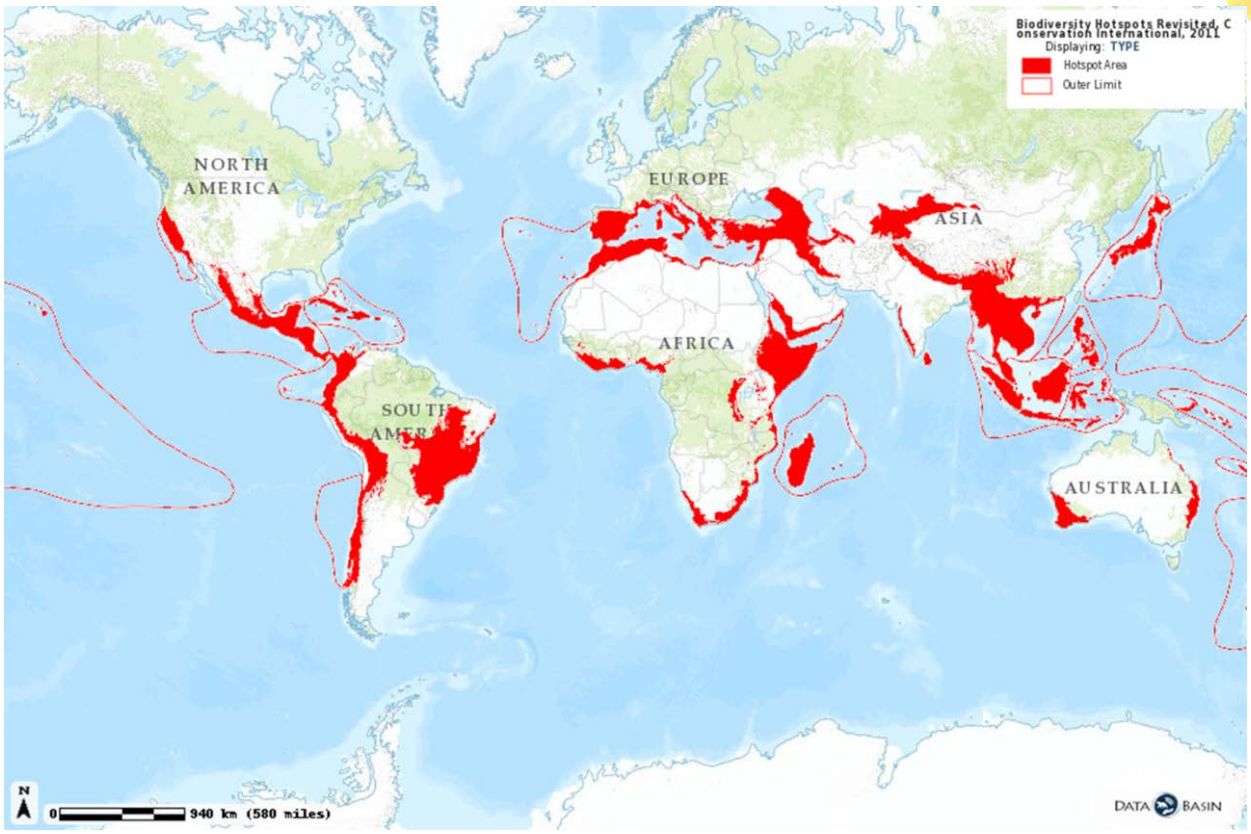


Figure I-5 : Carte de la distribution des points chauds de la biodiversité selon Myers *et al.* (2000) et Mittermeier *et al.* (2011). *Source :* http://databasin.org, Conservation Synthesis, Center for Applied Biodiversity Science at Conservation International.

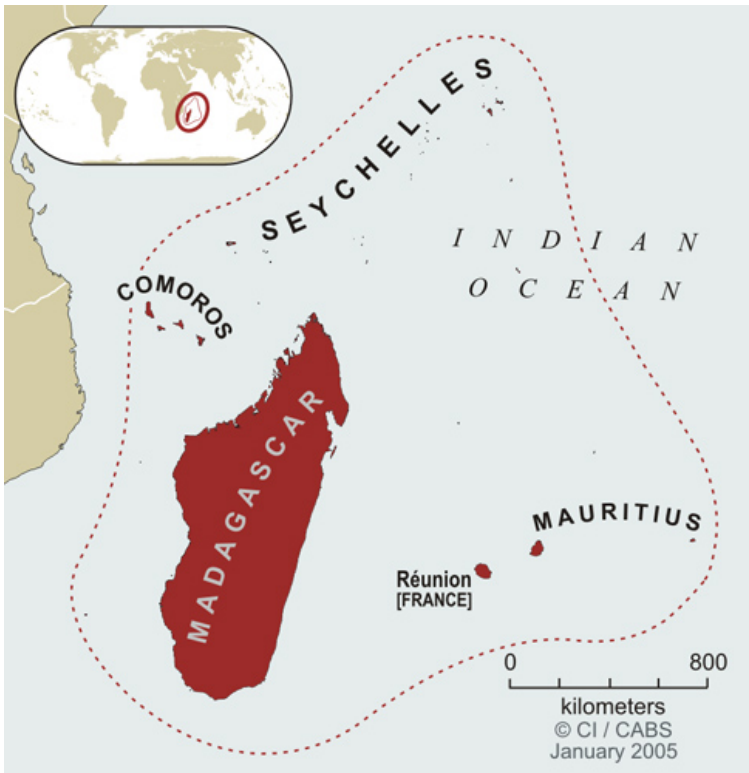


Figure I-6 : Délimitation du point chaud de biodiversité de Madagascar et des îles de l'Océan Indien. *Source :* http://www.cepf.net

L'ensemble de ces facteurs associés à une réduction voire une absence des flux de gènes à cause de l'isolement géographique favorise la divergence des populations insulaires et continentales. L'étude de Boff *et al.* (2014) a mis en évidence cette réduction de diversité génétique en fonction de la distance des îles au continent chez des populations d'abeille *Euglossa cordata* dans la région Brésilienne. La différenciation génétique entre la lignée colonisatrice de l'île et la lignée d'origine est d'autant plus forte que les taux d'immigration (flux de gènes) sont faibles. Dans les cas où les flux de gènes sont plus restreints, la lignée insulaire va diverger de la lignée d'origine et peut mener à une spéciation.

2.4. Contraintes abiotiques

Les caractéristiques des écosystèmes insulaires et leur fragile équilibre les rendent sensibles à des perturbations graves et irréversibles (Whittaker, 1998). Les milieux insulaires sont de véritables réservoirs d'espèces endémiques au point où de nombreux archipels sont classés comme *hotspots* (points chauds) de biodiversité (Mittermeier *et al.*, 2011, Myers *et al.*, 2000) (Figure I-5). Parmi eux, Madagascar et les îles du Sud-Ouest de l'océan Indien figurent dans le top 5 de ces zones (Figure I-6). Les critères des *hotspots* sont que ces régions abritent au moins 1500 espèces endémiques de plantes et qu'au moins 70% des habitats d'origine aient subi une destruction (Myers *et al.*, 2000). Au sein des îles, les plus forts taux d'endémisme ont souvent associés à des îles continentales telle que Madagascar ou à des îles océaniques tropicales de grande taille et atteignant des altitudes élevées telle que Hawaii (Whittaker, 1998).

Les pressions de sélection exercées par les environnements insulaires comme les conditions climatiques sont telles qu'elles favorisent une évolution rapide des traits d'histoire de vie. En effet, le climat des îles océaniques est fortement influencé par l'océan mais aussi par leur localisation géographique. Dans les îles des zones équatoriales et subéquatoriales, l'amplitude annuelle de température est très faible et reste aux alentours de 2°C (Gruza, 2002). En revanche pour les îles tropicales et subtropicales, la différence de température entre l'été et l'hiver est plus grande. Celle-ci peut varier de 6°C jusqu'à 20°C pour le cas des îles des Philippines en remontant jusqu'au Japon (Gruza, 2002). D'autre part, la distance entre l'île et la

masse continentale influence aussi le climat de celle-ci, en effet la masse d'air provenant du continent (qu'il soit chauffé ou frais) aura plus d'impact sur les températures de l'île à courte distance.

Enfin, la taille de l'île et sa topographie influence également le climat. Les îles de basse altitude présentent généralement des climats plus secs que celles de haute altitude. De même, les reliefs d'altitude permettent de générer des pluies tempérant la chaleur apportée par le climat océanique (Whittaker, 1998, Basist *et al.*, 1994). Des variations importantes des températures, du niveau des océans, et/ou de fréquences d'évènements climatiques peuvent impacter les taux d'extinction dans ces îles.

Néanmoins, les perturbations climatiques comme les cyclones ou encore la sècheresse sont des évènements ponctuels dont la fréquence annuelle est très variable.

2.5. Menaces anthropiques et biodiversité

Les perturbations liées à l'activité humaine menacent plus fortement, en continu, et à long terme les écosystèmes insulaires. La colonisation des îles par l'Homme a systématiquement été accompagnée d'une transformation des habitats *via* la déforestation et la mise en place de cultures, première cause d'extinction d'espèces (Mittermeier *et al.*, 2011, Pimm *et al.*, 1995, Sax and Gaines, 2008). En plus de cela, l'Homme a introduit et continue d'introduire des espèces exotiques. Parmi les espèces introduites certaines deviennent invasives et peuvent accélérer la dégradation de l'habitat comme l'exemple de la fourmi *Anoplolepis gracilipes* sur l'île de Christmas (O'Dowd et al., 2003). D'autres espèces introduites par mégarde menacent également les espèces indigènes par la prédation comme le cas du serpent arboricole *Boiga irregularis* et l'avifaune de l'île de Guam (Savidge, 1987). L'introduction volontaire d'espèces domestiques comme le chat *Felis catus* met en péril des espèces endémiques à l'image du pétrel de Barau *Pterodroma baraui* sur l'île de La Réunion dont la fécondité et croissance démographique ne permet pas de compenser les pertes provoquées par cette pression de prédation (Faulquier *et al.*, 2009).

L'introduction d'espèces peut avoir des conséquences sur la diversité génétique des espèces autochtones à l'échelle inter et intra-spécifique. En effet, l'Homme a pu contribuer à mettre en contact des populations isolées et divergentes d'espèces proches. Par exemple, des évènements d'hybridation entre deux espèces d'aleurodes (MEAM1 et IO) du complexe d'espèces de *Bemisia tabaci* (Delatte *et al.*, 2006) remises en sympatrie (à La Réunion) ont été observés suite à une récente introduction de l'une des espèces. Si l'hybridation peut favoriser l'augmentation de la diversité génétique des populations insulaires, elle contribue souvent à la perte de patrimoine génétique unique par l'introgression du génome d'une population/espèce exotique dans celui de la population/espèce insulaire. L'introgression peut s'effectuer dans le cas d'une compatibilité forte (n'ayant pas divergé depuis longtemps et avec une absence d'isolement reproducteur) entre populations/espèces.

D'autre part, les hybridations contribuent à effacer les signaux génétiques permettant de retracer les évènements démographiques comme les goulots d'étranglement (Emerson, 2002). Il est important de préserver l'intégrité des populations insulaires d'autant que les pollutions génétiques peuvent également mener à l'extinction (Rhymer and Simberloff, 1996).

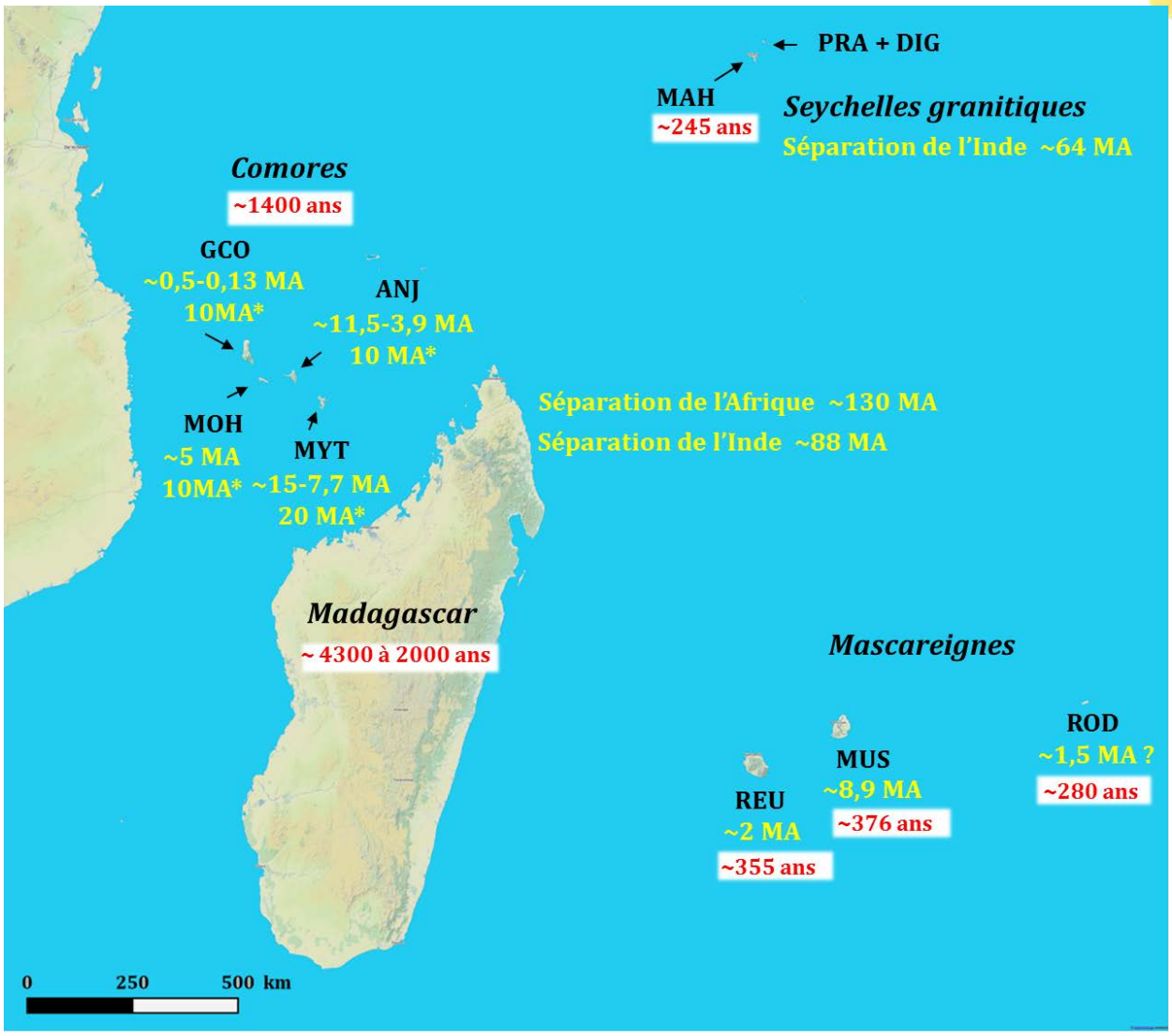


Figure I-7 : Carte de la disposition actuelle des îles de la zone Sud-Ouest de l'Océan Indien avec indication de leur âge géologique estimé (en jaune) et l'âge des premières colonisations durables par l'Homme (en rouge). Pour l'archipel des Comores, le deuxième âge estimé par des données géochronologiques selon Michon (*in press.*) sont indiquées par *. REU : La Réunion, MUS : Maurice, ROD : Rodrigues, MAH : Mahé, PRA : Praslin, DIG : La Digue, GCO : Grande Comore, ANJ : Anjouan, MOH : Mohéli et MYT : Mayotte. *Source du fond de carte :* Open Layer Landscape.

3. Cadre de l'étude : les îles du Sud-Ouest de l'océan Indien

La zone Sud-Ouest de l'océan Indien (SOOI) abrite plusieurs îles océaniques et continentales (Figure I-7). La variabilité des caractéristiques de ces îles offre une opportunité d'améliorer les connaissances sur les processus évolutifs en milieu insulaire. Les îles diffèrent de par leur origine géologique, âge, superficie, distance aux continents, diversité des habitats et conditions climatiques. La taille des îles du SOOI varie de 587 040 km² pour Madagascar à moins d'0.1 km² pour la plus petite des îles dans l'archipel des Seychelles.

Madagascar est située à 400 km à l'Est de l'Afrique (Figure I-7). L'archipel des Comores, constitué des îles de la Grande Comore, Anjouan, Mohéli et Mayotte, se situe à environ 300 km au Nord-Ouest de Madagascar dans le canal du Mozambique. L'archipel des Mascareignes, composé des îles de La Réunion, Maurice et Rodrigues, se trouve entre 900 et 1500 km à l'Est de Madagascar. L'archipel des Seychelles s'étend au Nord de Madagascar (plus de 1100 km) et est composé de plus d'une centaine d'îles.

3.1. Formation géologique des îles

La compréhension des processus évolutifs dans le SOOI nécessite de connaître l'histoire géologique de ces îles. Madagascar et les îles granitiques des Seychelles dont font partie Mahé, Praslin et La Digue étaient rattachées au super continent du Gondwana il y a plus 160 millions d'années (MA) (Coffin and Rabinowitz, 1987). Le groupe « Madagascar - Seychelles granitiques – Inde » se serait séparé de l'Afrique il y a environ 130 MA puis Madagascar se serait séparée des « Seychelles - Inde » il y a 88 MA (Coffin and Rabinowitz, 1987, Rabinowitz *et al.*, 1983, Storey *et al.*, 1995) (Figure I-7 et I-8). Suite à cela, le groupe « Seychelles - Inde » aurait commencé à se déplacer vers le Nord et les Seychelles granitiques se seraient détachées de l'Inde il y a environ 64 millions d'années (Plummer and Belle, 1995).

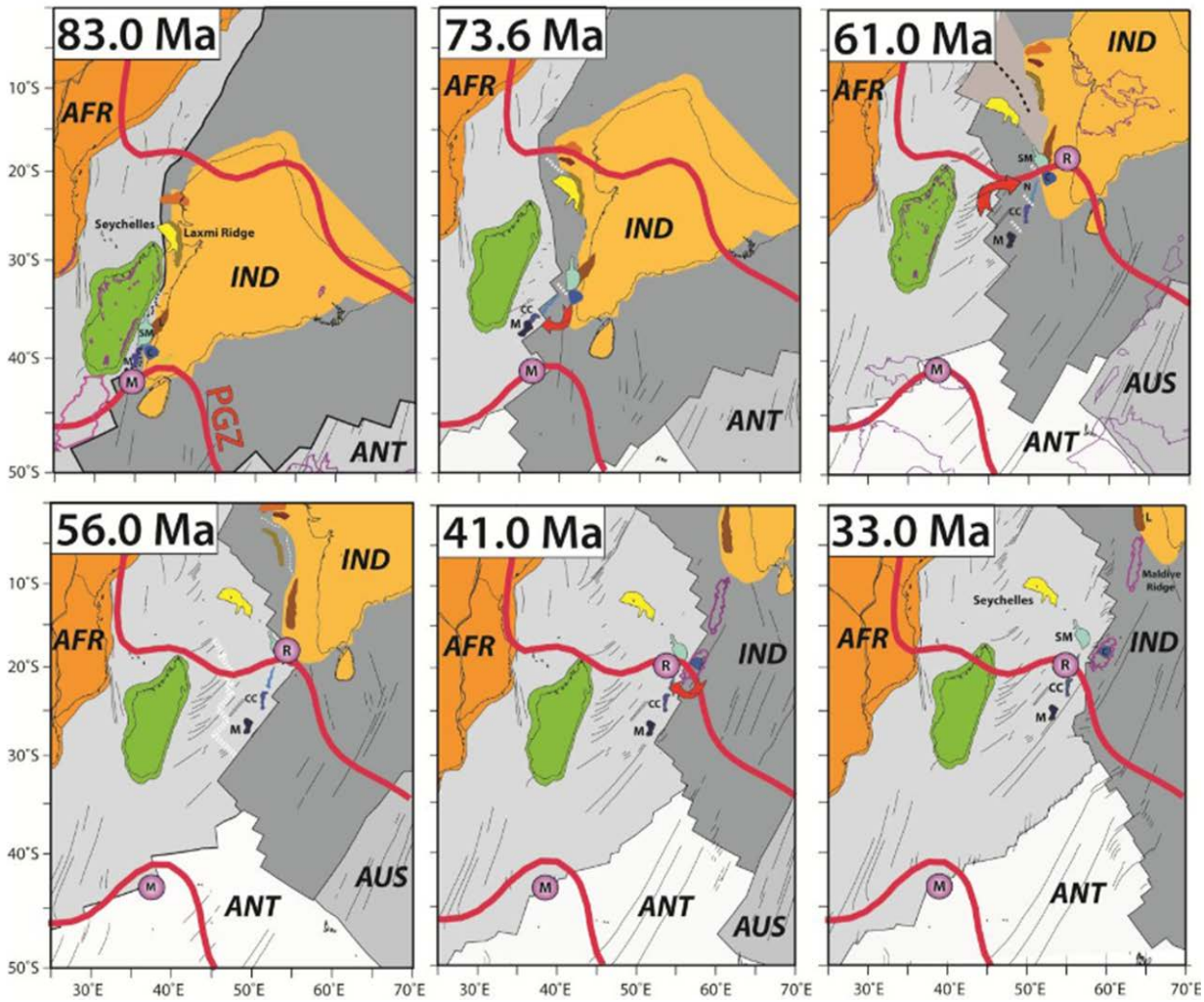
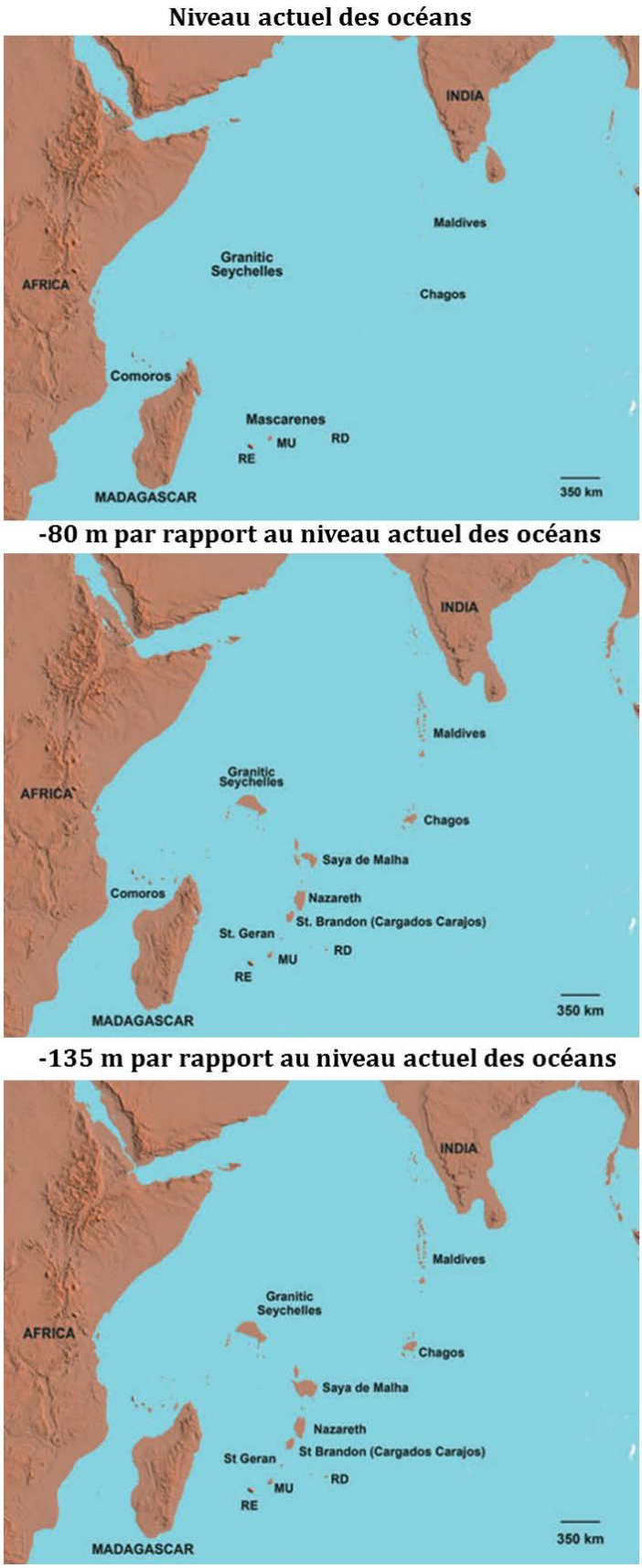


Figure I-8 : Reconstructions de la tectonique des plaques au niveau de l'océan Indien du Crétacé tardif au Miocène. M dans un cercle mauve: île Marion ; R dans un cercle mauve : point chaud de La Réunion ; en vert : Madagascar ; M noir : représente le plateau des Mascareignes sur lequel se situe Maurice. AFR : plaque africaine, IND : plaque indienne, ANT : plaque antarctique. *Source* : (Torsvik et al., 2013).

Le deuxième groupe d'îles « vraies » le plus ancien du SOOI est l'archipel des Comores dans le canal du Mozambique. Plusieurs méthodes ont été utilisées pour estimer l'âge des îles (dont la radiométrie des laves les plus anciennes). L'île la plus ancienne est celle de Mayotte avec une apparition il y a entre 15 et 7,7 MA; Anjouan aurait été formée il y a entre 11,5 et 3,9 MA, Mohéli il y a 5 MA et la Grande Comore, l'île la plus jeune, serait apparue il y a 0,5 à 0,13 MA (Emerick and Duncan, 1982b, Montaggioni and Nougier, 1981, Nougier *et al.*, 1986) (Figure I-7).

La formation géologique des Comores a fait l'objet d'avis divers depuis les années 1970 mais les travaux de Michon (*in press.*,) suggèrent que l'hypothèse de volcanisme de point chaud doit être écartée. Les données géochronologiques plus récentes montrent que l'archipel serait plus ancien avec un début d'activité magmatique il y a 20 MA à Mayotte, puis simultanément il y a 10 MA pour les trois autres îles (Michon, *in press.*,). Le début du magmatisme des Comores coïnciderait avec une activité sismique liée à la déformation du rift est-africain (Michon, *in press.*,).

L'archipel des Mascareignes est également assez jeune et d'origine volcanique, est le plus jeune des systèmes étudiés. La Réunion, Maurice et Rodrigues ont émergé par un volcanisme de point chaud, encore actif à La Réunion avec le Piton de La Fournaise (Bonneville *et al.*, 1988, Faure, 2013). Selon la datation des laves les plus anciennes, l'âge de Maurice est estimé à 8,9 ± 0,17 millions d'années, celui de La Réunion à 2,0 ± 0,05 millions d'années et Rodrigues à 1,5 ± 0,05 millions d'années (McDougall, 1971, McDougall and Chamalaun, 1969, Moore *et al.*, 2011, McDougall *et al.*, 1965, Montaggioni, 1976) (Figure I-7). Toutefois, la datation de l'âge géologique de Rodrigues semble bien plus ancienne mais difficile à statuer du fait de l'érosion et de l'enfoncement de l'île dans l'océan (Hume, 2005). Aussi Rodrigues ne serait pas l'île la plus jeune mais serait au moins aussi âgée que Maurice (Thébaud *et al.*, 2009). Ces trois îles varient en taille et en distance à Madagascar.



- Niveau atteint 9 fois au cours des 100 000 dernières années.
- Niveau atteint 46 fois au cours des 1,3 dernières millions d'années.

- Niveau atteint il y a 17 500, 30 000 et 630 000 années.

Figure I-9 : Carte présentant la variation des niveaux des océans au cours des temps géologiques dans la zone Sud-Ouest de l'océan Indien. Cette carte supporte le modèle *stepping-stone* dans cette région avec l'alternance entre émergence et disparitions d'îles provenant de la plaque Mascareignes. *Source* : (Warren *et al.*, 2010).

La Réunion est la plus grande avec 2512 km², suivie de Maurice avec 1865 km² et enfin Rodrigues, la plus petite, avec seulement 104 km² de superficie. Une autre particularité de cet archipel, est que Maurice se situe sur le plateau des Mascareignes contrairement aux deux autres îles. La variation du niveau des océans a provoqué l'alternance de l'émergence puis submersion à intervalle régulier d'îles proches de Maurice sur ce plateau (Warren *et al.*, 2010) (Figure I-9). A l'heure actuelle, une partie dont St Brandon, l'archipel de Chagos et des Maldives ont encore des parties émergées.

3.2. Conditions climatiques, topographie et diversité des habitats

Les archipels du SOOI se situent dans la zone des climats intertropicaux dont le climat tropical humide est alterné par une saison sèche et une saison des pluies (Godard and Tabeaud, 1998) (Figure I-10). Ce climat est fortement influencé par les alizées, des vents d'Est qui lorsqu'ils entrent en contact avec des obstacles topographiques déversent d'importantes précipitations. Les variations de températures sont différentes entre l'archipel des Mascareignes dont le climat est légèrement moins chaud qu'aux Seychelles et aux Comores qui sont plus proches de l'équateur. Par exemple lors de la saison chaude à La Réunion les températures moyennes varient entre 21 et 31°C sur la côte et de 10 à 24°C à 1000m contre 17 à 28°C sur la côte et de 8 à 10°C dans les hauts pendant la saison fraîche (Météo France). En comparaison, aux Seychelles les températures annuelles oscillent entre 24 et 32°C. Les îles du SOOI sont également soumises à des épisodes cycloniques exceptionnels se formant à la surface des océans notamment lors de la saison la plus chaude (pluies). Ces perturbations sont d'intensité et de dimensions variables pouvant atteindre plus de 1000 km d'envergure (ex : Gamède en 2007 dans les Mascareignes, Météo France). Les cyclones associent des vents violents (rafales pouvant atteindre plus de 200 km/h) et des précipitations exceptionnelles. La Réunion possèdent des records mondiaux de pluviométrie (ex : 4936 mm en 96 heures) mais aussi de vents (~277 km/h) à cause des cyclones (Météo France).

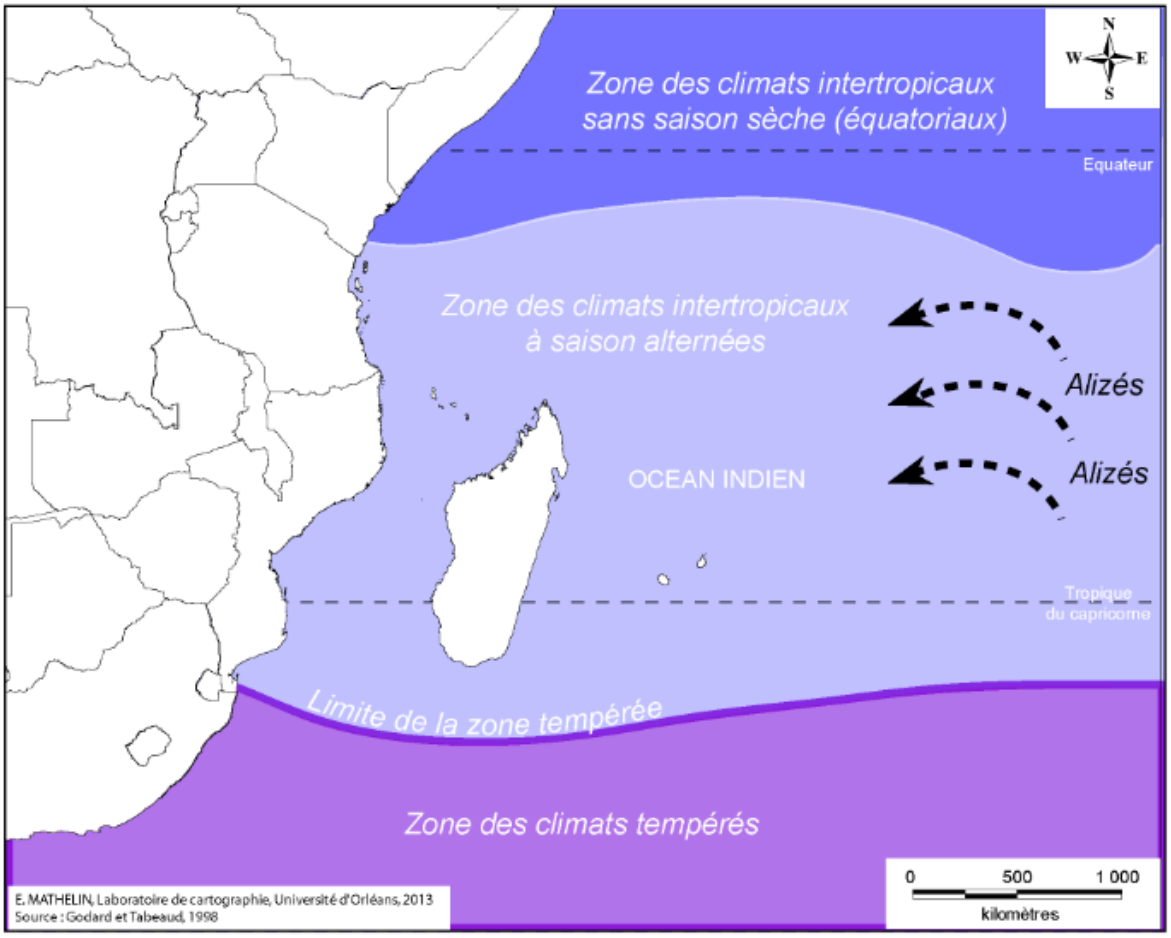
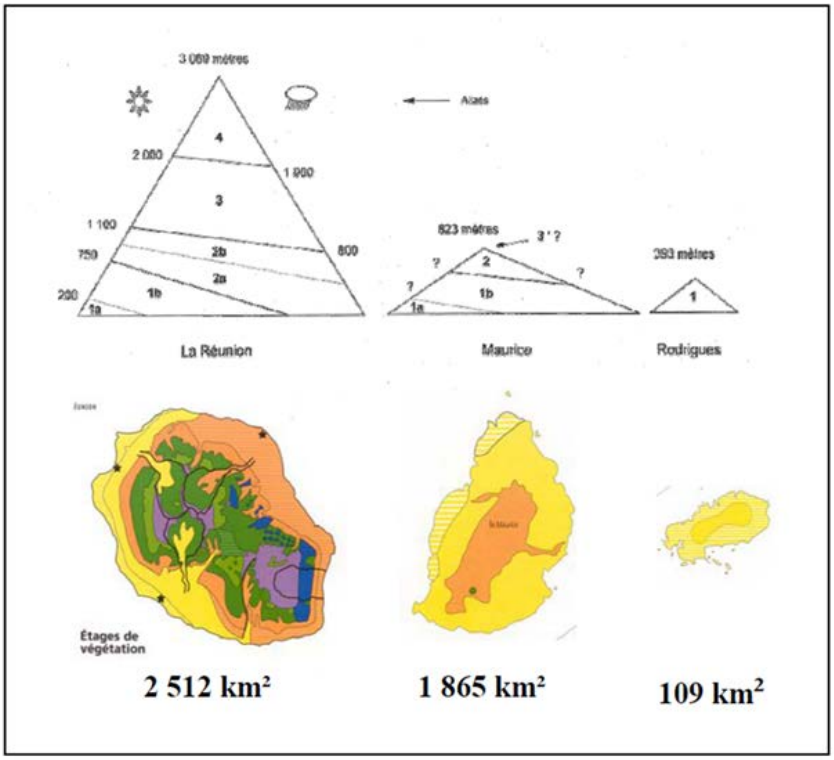


Figure I-10 : Carte de la zone Sud-Ouest de l'océan Indien présentant la délimitation des zones climatiques. *Source* : E. Mathelin selon Godard and Tabeaud (1998).

.



Légende :

1a : Savanes à Palmiers et Ebeniers
1b : Forêts à Ebeniers
2a : Forêts à Sapotacées de moyenne altitude
3 : Forêts à Sterculiacées
4 : Fourrés d'Ericacées

Figure I-11 : Représentation schématique de l'étagement de la végétation en fonction de l'altitude et de l'orientation aux alizées. *Source* : (Blanchard, 2000).

Le climat des îles du SOOI est également influencé par leur topographie. Madagascar possède une diversité de conditions climatiques du fait de sa large superficie de 592 000 km² associée à des variations altitudinales. La Réunion possède le point le plus haut de l'océan Indien avec le volcan éteint du Piton des Neiges culminant à 3070 m. Seule l'île de Grande Comore présente aussi une haute altitude avec le Karthala d'une hauteur de 2361 m. Le relief de La Réunion offre une variété de milieux avec à l'échelle de l'île, la côte Est exposée au vent et plus humide (que la côte Ouest sous le vent). D'autre part, une variation climatique interne due au gradient altitudinal est plus forte à La Réunion qu'à Maurice et à Rodrigues (Figure I-11). Le gradient climatique structure la végétation où les îles les plus hautes possèdent un plus large panel d'habitats (Cadet, 1980, Le Péchon, 2009). En plus de ces conditions climatiques et topographiques exceptionnelles, Madagascar et les archipels du SOOI possèdent une diversité d'habitats importante. Les fortes pluviométries et températures chaudes permettent à des forêts tropicales de se développer sur ces îles.

Toutefois, certains types de végétation comme les forêts éricoïdes (formation à bruyères de montagne) ne se retrouvent qu'au-delà des 1000 m d'altitude et ne sont pas présentes dans toutes les îles du SOOI (La Réunion, Madagascar et Grande Comore). En revanche, toutes les îles présentent des végétations de basse altitude soumise à des températures plus sèches comme les savanes ou forêts sèches.

3.3. *Hotspot* de biodiversité et déforestation

Selon Myers *et al.* (2000), Madagascar et les archipels alentours (Mascareignes, Seychelles et Comores) sont considérés comme l'un des 35 points chauds de biodiversité, zones géographiques les plus riches en espèces endémiques et les plus menacées par la disparition des habitats naturels originaux (Figure I-5 et I-6). Madagascar et les trois archipels alentours concentrerait au moins 13 000 espèces de plantes dont 11 600 endémiques, dont 183 espèces endémiques d'oiseaux (sur un total de 313 décrites), 367 espèces endémiques de reptiles (sur 381), 97 espèces endémiques de poissons d'eaux douces (sur 164), 249 d'espèces endémiques

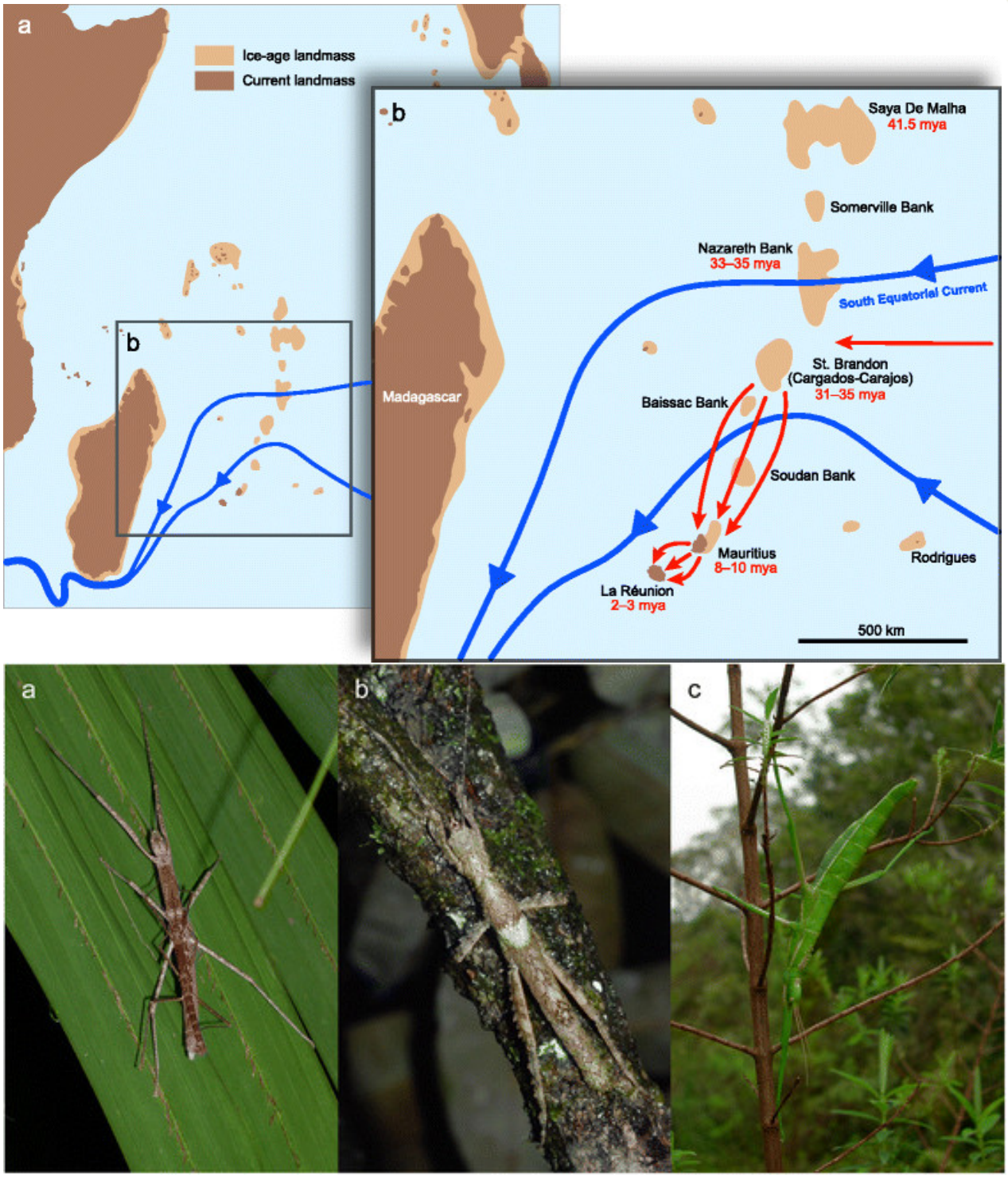


Figure I-12 : Scénario de colonisation et de diversification des insectes de l'ordre *Phasmatodea* à La Réunion et à Maurice. Selon le modèle *stepping-stone*, les ancêtres des phasmes endémiques (voir photos) sont passés par les îles émergées lors de la variation du niveau des océans et s'y sont diversifiés avant de coloniser les Mascareignes. En bas, a) couple d'*Apterograeffea reunionensis* (La Réunion), *b) mâle d'Epicharmus marchali* (Maurice) et c) femelle *Rhaphiderus spiniger*. *Source* : (Bradler *et al.*, 2015)

d'amphibiens et 192 espèces de mammifères endémiques (sur les 200 décrits) (Mittermeier *et al.*, 2011). Toutefois, ce nombre n'est pas définitif et certains groupes comme les macro-invertébrés, sont sous-estimés. Les dernières études ont recensé un peu moins de 5 800 espèces d'invertébrés à Madagascar dont 86% sont endémiques (Goodman and Benstead, 2005), tandis qu'aux Seychelles plus de 3 600 espèces d'invertébrés ont été identifiés dont 80% seraient endémiques (Gerlach, 2012, Gerlach, 2003). La radiation évolutive de certains groupes d'espèces dans ce large système insulaire a pu être démontrée par l'usage d'outils moléculaires, comme le cas des oiseaux du genre *Foudia* ou *Zosterops* (Warren *et al.*, 2012, Warren *et al.*, 2006), des coléoptères de la tribu des *Cratopini* (Kitson, 2012) ou encore des orchidées du genre *Angraecum* (Micheneau *et al.*, 2008). De nombreuses espèces endémiques dans les archipels du SOOI notamment dans les Mascareignes trouvent leur origine à Madagascar. Toutefois, l'étude de Warren *et al.* (2010) montre que la biodiversité de la région SOOI possède également des origines asiatiques.

La colonisation des îles du SOOI par des espèces si distantes géographiquement peut s'expliquer par les évènements climatiques liés aux moussons mais surtout par le modèle *stepping–stones* (Figure I-9). Cette stratégie de colonisation consiste pour une espèce donnée, à s'installer progressivement dans les îles de proche en proche. Dans le SOOI, ce processus pourrait être congruent avec les datations des phylogénies démontrant des affinités asiatiques chez les oiseaux des genres *Zosterops*, *Hypsipetes*, *Psitticula*, *Otus* et *Aerodramus* (Warren *et al.*, 2010). Le niveau des océans aurait extrêmement varié avec des intervalles allant de 80 m plus bas que le niveau actuel il y a 1,3 MA à 100 000 ans, jusqu'à 135 m de moins il y a 17 500, 30 000 et 630 000 ans. Ces baisses du niveau de la mer a permis l'émergence de surfaces terrestres du plateau des Mascareignes formant des îles temporaires. Ces îles ont formé « un chemin » entre l'Inde, l'archipel des Mascareignes et Madagascar. Récemment, le modèle *stepping-stone* a permis d'élaborer les scénarios de dispersion et de colonisation des insectes du genre *Phasmatodea* (phasme) à La Réunion et Maurice (Bradler *et al.*, 2015). Les phasmes auraient d'abord connus une spéciation sur les îles de Saint Brandon puis auraient continué à évoluer dans les Mascareignes (Figure I-12).

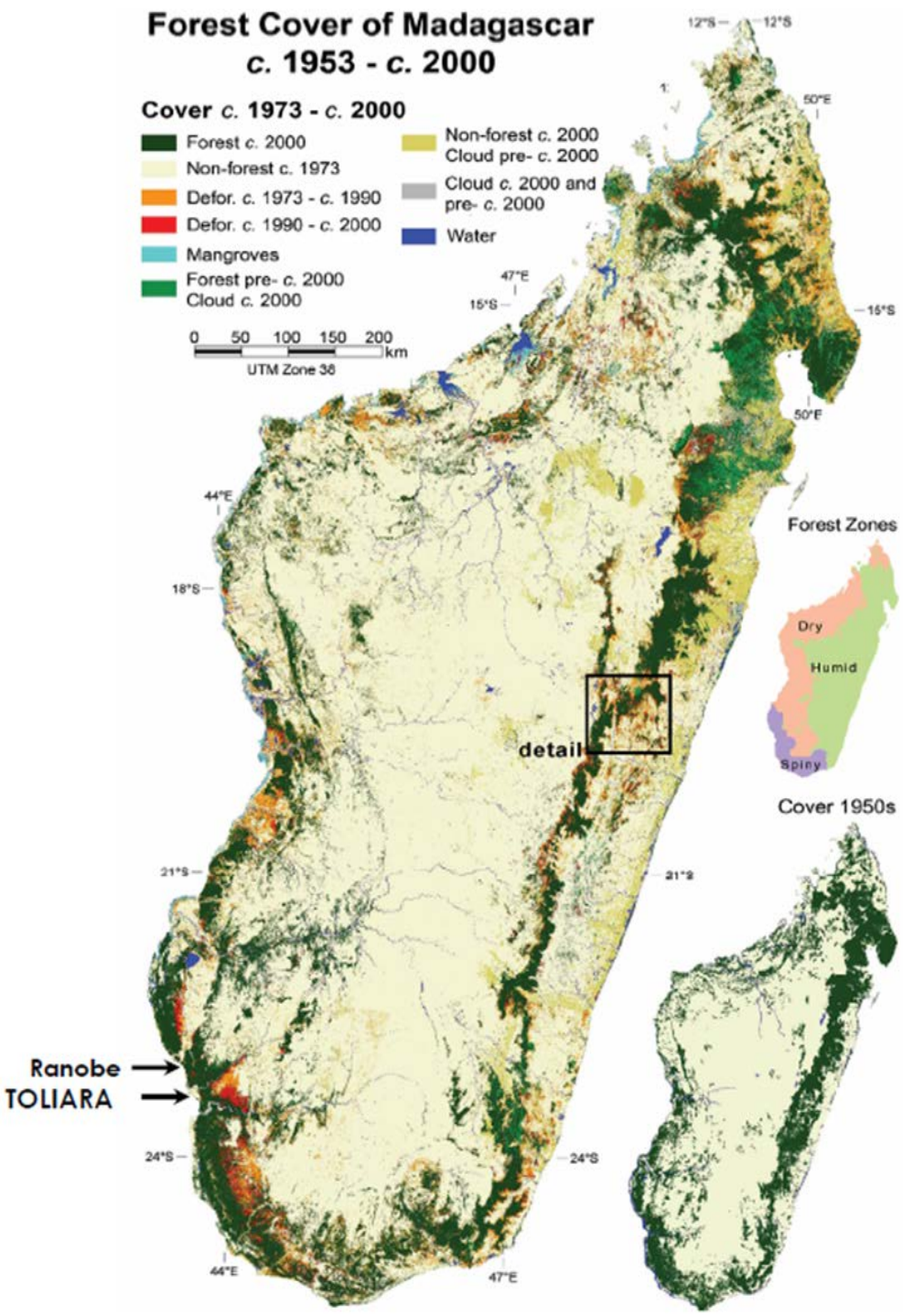


Figure I-13 : Carte de la déforestation de Madagascar et présentant l'évolution de couverture forestière entre 1950 et 200. *Source* : (Harper *et al.,* 2007).

Toutefois, une partie de la biodiversité exceptionnelle présente dans cette région a déjà disparu suite à la colonisation de ces îles par l'Homme. Certaines espèces se sont éteintes comme le cas du Dodo *Raphus cucullatus* à Maurice (Quammen, 1996, Cheke, 2014) et de l'ibis de La Réunion *Borbonibis latipes* (Mourer-Chauviré and Moutou, 1987) et d'autres sont menacées ou en danger critique d'extinction comme le coco de mer *Lodoicea maldivica* aux Seychelles (Rist *et al.*, 2010, Swabey, 1970) ou encore le lézard vert de Manapany *Phelsuma inexpectata* à La Réunion (Sanchez and Probst, 2011). En plus de la dégradation des milieux, l'introduction d'espèces prédatrices comme les rats et les chats impactent la faune indigène (Zavaleta *et al.*, 2001, Magnanou, 2005). Ces pressions s'ajoutent aux perturbations environnementales qui influencent naturellement la biodiversité insulaire comme avec le cas des éruptions volcaniques. À La Réunion, les populations de l'oiseau endémique *Coracina newtoni* aurait d'abord subit un fort goulot d'étranglement suite à une épisode volcanique il y a environ 5 000 ans, et le déclin de sa population aurait continué à s'accentuer avec l'arrivée de l'Homme *via* la déforestation et l'introduction de prédateurs (Salmona *et al.*, 2012). La dégradation des habitats par l'Homme menace la biodiversité de ces archipels mais n'atteint pas les mêmes degrés dans toutes ces îles océaniques. Dans les années 1950, la couverture forestière de Madagascar n'était plus que de 27% du territoire alors qu'il a été estimé que 90% de l'île était originalement recouverte de forêts (Harper *et al.*, 2007) (Figure I-13). Entre 1950 et 2000, la déforestation croissante a continué à détruire les habitats originels et la couverture forestière actuelle ne serait plus que d'environ 16%, de plus, ces habitats naturels ont subi une forte fragmentation (Harper *et al.*, 2007).

Il est évident qu'une perte d'habitat rapide provoque des extinctions également rapides dans les communautés végétales et animales établies. Toutefois, la déforestation peut aussi avoir des impacts sur les populations à une échelle plus lente *via* la fragmentation des habitats. D'ailleurs, Craul *et al.* (2009) ont montré que la fragmentation de forêts au Nord-ouest de Madagascar a eu un impact sur la diversité génétique et les tailles de populations de lémurien *Lepilemur edwardsi*.

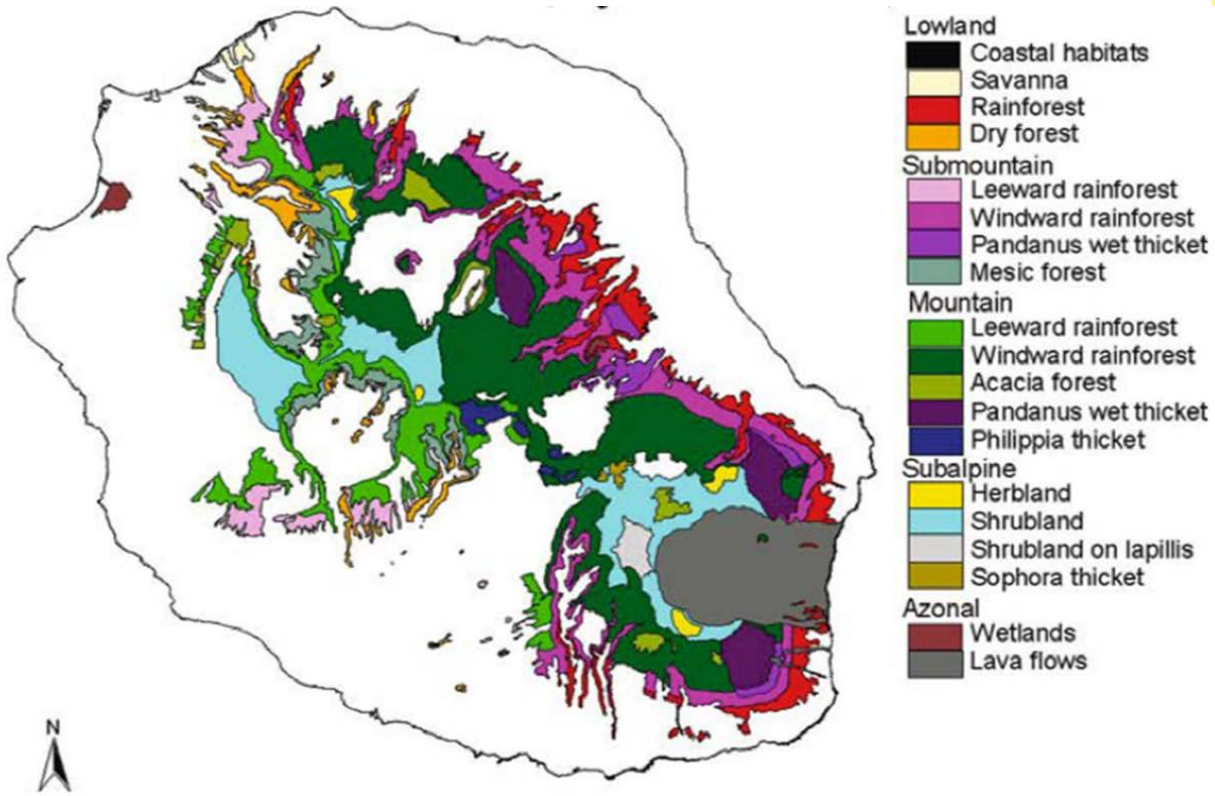


Figure I-14 : Carte de la répartition des habitats originaux à La Réunion suite à la colonisation et dégradation des milieux. *Source* : (Strasberg *et al.*, 2005).

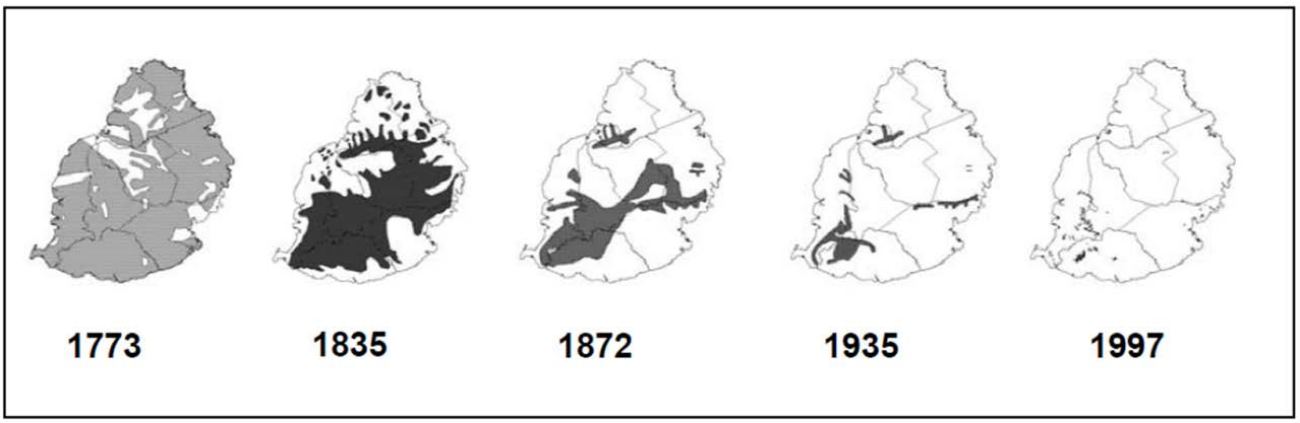


Figure I-15 : Evolution historique du couvert végétal à l'île Maurice. *Source :* D'après J. Mauremootoo, (Triolo, 2005).

La Réunion est l'une des îles les mieux préservée avec 25% des habitats originels et ce grâce au relief et de son jeune âge géologique (Strasberg *et al.*, 2005) (Figure I-14). L'une des dernières reliques de forêt tropicale de basse altitude sur cette île se situe dans le Sud-Est à Mare Longue où le sol d'origine basaltique n'est pas suffisamment meuble pour être exploité pour le moment. Au sein de l'archipel des Mascareignes, la déforestation a été plus forte sur l'île de Maurice avec seulement 2% de la végétation originelle qui demeurent tandis qu'à Rodrigues 100% des habitats d'origines ont été détruits (Florens *et al.*, 2012, Thébaud *et al.*, 2009) (Figure I-15).

L'archipel des Comores possèderait le 4ème taux de déforestation au niveau mondial (soit 5,8% par an depuis les années 1990) : avec environ 30% des forêts originelles détruites à Mohéli entre 1983-1996 et plus de 85% à Anjouan entre 1972 et 1987 (Sewall *et al.*, 2003) (Figure I-16). Il est estimé à l'heure actuelle que seul 2,9% de l'archipel des Comores est couvert de forêts (http://rainforests.mongabay.com).

En ce qui concerne l'archipel des Seychelles, le taux de déforestation n'est pas bien connu mais lors du XIXe siècle, les forêts ont été exploitées et la flore indigène a été en partie remplacée par la culture de cannelle. En 1870, seuls quelques reliquats de forêts indigène persistaient dans les hautes altitudes (Finger *et al.*, 2012) (Figure I-17).

3.4. Colonisation des îles du SOOI par l'Homme

Les îles du SOOI diffèrent non seulement d'un point de vue écologique, géologique mais aussi historique. Selon la paléontologie, Madagascar serait l'île la plus anciennement colonisée par l'Homme dans le SOOI. Les fossiles ont permis d'avancer que cette île continentale aurait été colonisée par l'Homme il y a 4300 à 1500 ans (Burney *et al.*, 2004, Douglass and Zinke, 2015). Les origines du langage et le patrimoine génétique de la population humaine à Madagascar indiquent des origines africaines et asiatiques (Hurles *et al.*, 2005) et la colonisation a probablement impliqué des populations nomades d'Indonésie (Kusuma *et al.*, 2015).

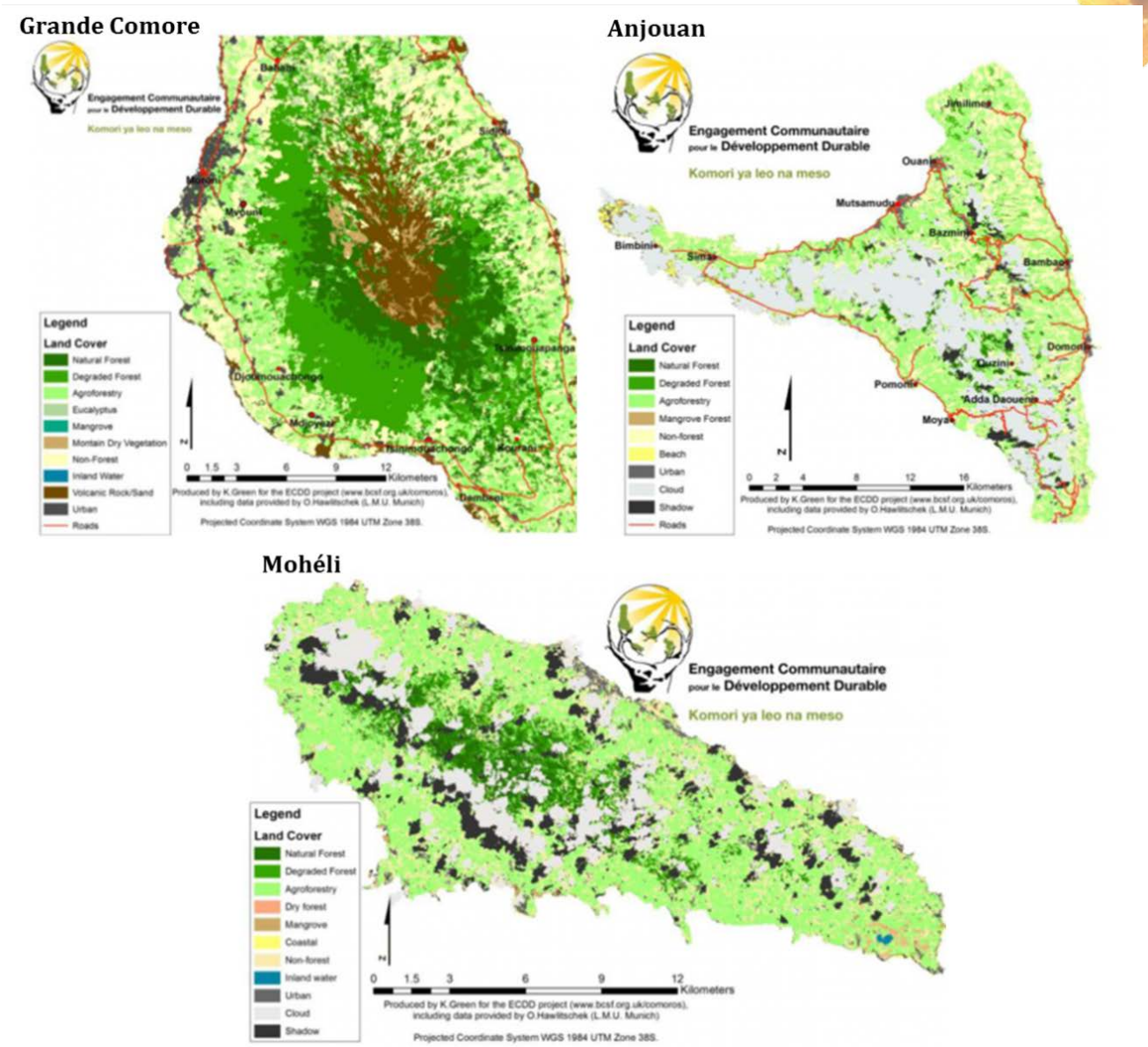


Figure I-16 : Carte de la couverture forestière des îles de Grande Comore, Anjouan et Mohéli. *Source :* Rapport de l'engagement communautaire pour le Développement Durable, 2013. http://www.ecddcomoros.org

L'archipel des Comores aurait ensuite été colonisé par des groupes africains, protohistoriques malgaches et arabes au moins depuis le VIIIe siècle sur Mohéli et Mayotte (Cheke, 2010). Certaines datations suggèrent que la Grande Comore aurait abrité des peuplements possédant des animaux domestiques au moins depuis le Ve siècle (Cheke, 2010).

Les îles des archipels des Seychelles et des Mascareignes auraient quant à elles été découvertes beaucoup plus tard par les arabes au début du XIVe et par les portugais au XVIe siècle. Les premières colonisations durables dans ces îles ont été d'origines européennes avec une première installation de colons Néerlandais à Maurice en 1639, de colons Français à La Réunion en 1660 puis à Rodrigues en 1735 et aux Seychelles en 1770. Durant la période colonisatrice, les îles du SOOI étaient connectées par les échanges maritimes entre les colonies *via* la route des Indes. De nombreuses espèces commensales ont été introduites accidentellement par les colons comme le rat noir ou volontairement comme le cas des animaux domestiques tels que les vaches, chèvres, volailles, chiens, chats et voire abeille mellifère (Cheke, 2010).

A ce jour les politiques de gestion de la biodiversité (protection des habitats, prévention des espèces invasives, conservation,...) sont différentes d'une île à une autre. La Réunion et Mayotte sont des départements d'outre-mer soumis au droit français et de l'Union Européenne. Madagascar est un pays qui est devenu indépendant de la France depuis 1960 et l'union des Comores qui fédère la Grande Comore, Anjouan et Mohéli a obtenu son indépendance de la France un peu plus tard en 1975. La République de Maurice a obtenu son indépendance du Royaume-Uni en 1968 et est un Etat composé de l'île Maurice et Rodrigues ainsi que des îles Agalega et de l'archipel de Saint Brandon. En 2002, Rodrigues a elle-même acquis son autonomie par rapport à Maurice. Enfin, les Seychelles forment également une république qui a obtenu son indépendance du Royaume-Uni depuis 1976.

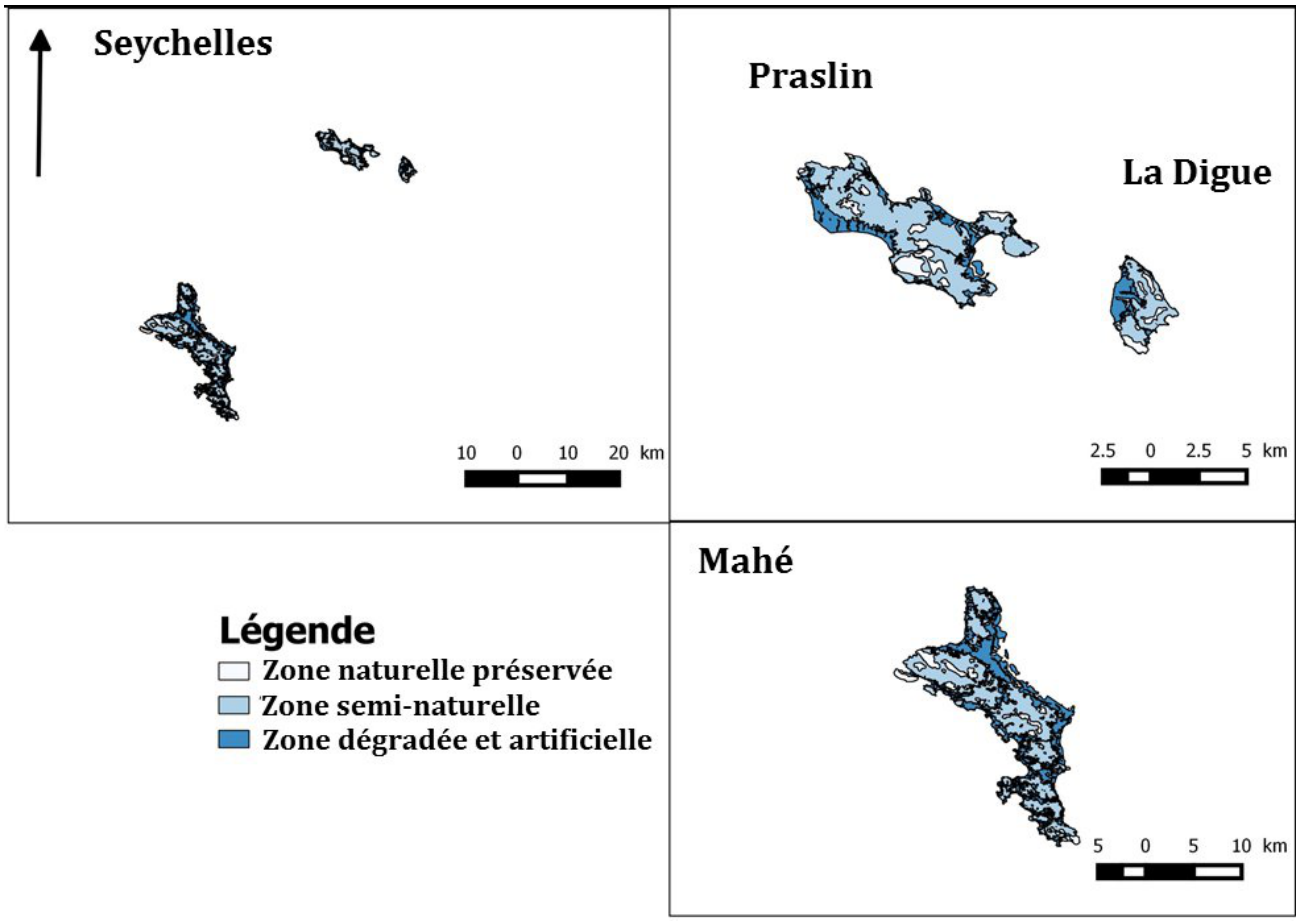


Figure I-17 : Carte de la répartition des zones naturelles sur les trois îles principales des Seychelles. *Source* : (Senterre and Wagner, 2014)

Figure I-18 : Modèle de l'étude l'abeille domestique, *Apis mellifera.* A gauche, deux ouvrières butinant des fleurs de *Dombeya* et à droite, une colonie d'abeille avec une reine au centre (La Réunion). *Crédit* : A. Franck et M. Techer.

4. Le modèle d'étude : l'abeille domestique *Apis mellifera*

L'abeille *Apis mellifera* est une espèce pollinisatrice distribuée mondialement ayant un rôle clé dans les écosystèmes terrestres (Figure I-18). L'importance de son rôle dans les milieux naturels en particulier tropicaux est difficile à estimer mais de par sa capacité généraliste elle intervient dans la reproduction d'une large gamme d'angiospermes (plantes à fleurs) sauvages. Elle contribuerait avec d'autres pollinisateurs, à plus de 80% des services de pollinisation de l'agriculture mondiale (Winston, 1991, Carreck and Williams, 1998, Breeze *et al.*, 2011, Breeze *et al.*, 2014) qui ont été estimés à 153 milliards d'euros par an (Klein *et al.*, 2007, Gallai *et al.*, 2009). La pollinisation des abeilles dans les cultures fruitières améliorerait le rendement en comparaison à la pollinisation par le vent, bien moins efficace (Klatt *et al.*, 2014). L'Homme porte également un intérêt tout particulier à l'abeille mellifère pour sa capacité à produire du miel, de la gelée royale, de la cire mais aussi de pouvoir récolter du pollen et de la propolis (Crane, 1990, Crane, 1999). Cette espèce aussi connue sous le nom d'abeille « domestique » est exploitée par l'Homme en apiculture depuis environ 7000 ans (Crane, 1990). La confusion apportée par son nom vernaculaire fait croire à tort qu'elle est uniquement domestique or *Apis mellifera* est capable de se maintenir dans les milieux naturels sans l'aide de l'Homme.

Les enjeux écologiques et économiques liés à *A. mellifera* ont favorisé la multiplication des études pour mieux comprendre sa biologie, son écologie ou encore son histoire évolutive. Ces études ont majoritairement été menées sur l'abeille domestique en zone tempérée, comme en Europe où l'apiculture s'est professionnalisée et est intensive (De la Rúa *et al.*, 2009). Pourtant cette espèce est naturellement distribuée dans des régions tropicales et insulaires où l'apiculture y est souvent plus traditionnelle et réalisée avec des populations locales d'abeilles.

4.1. Taxonomie et origine d'*A. mellifera*

Les abeilles appartiennent à l'ordre des Hyménoptères qui constitue le second ordre le plus diversifié des insectes et comprend notamment les fourmis, les guêpes et les bourdons (Michener, 2000). Elles seraient apparues au cours du Crétacé, il y a

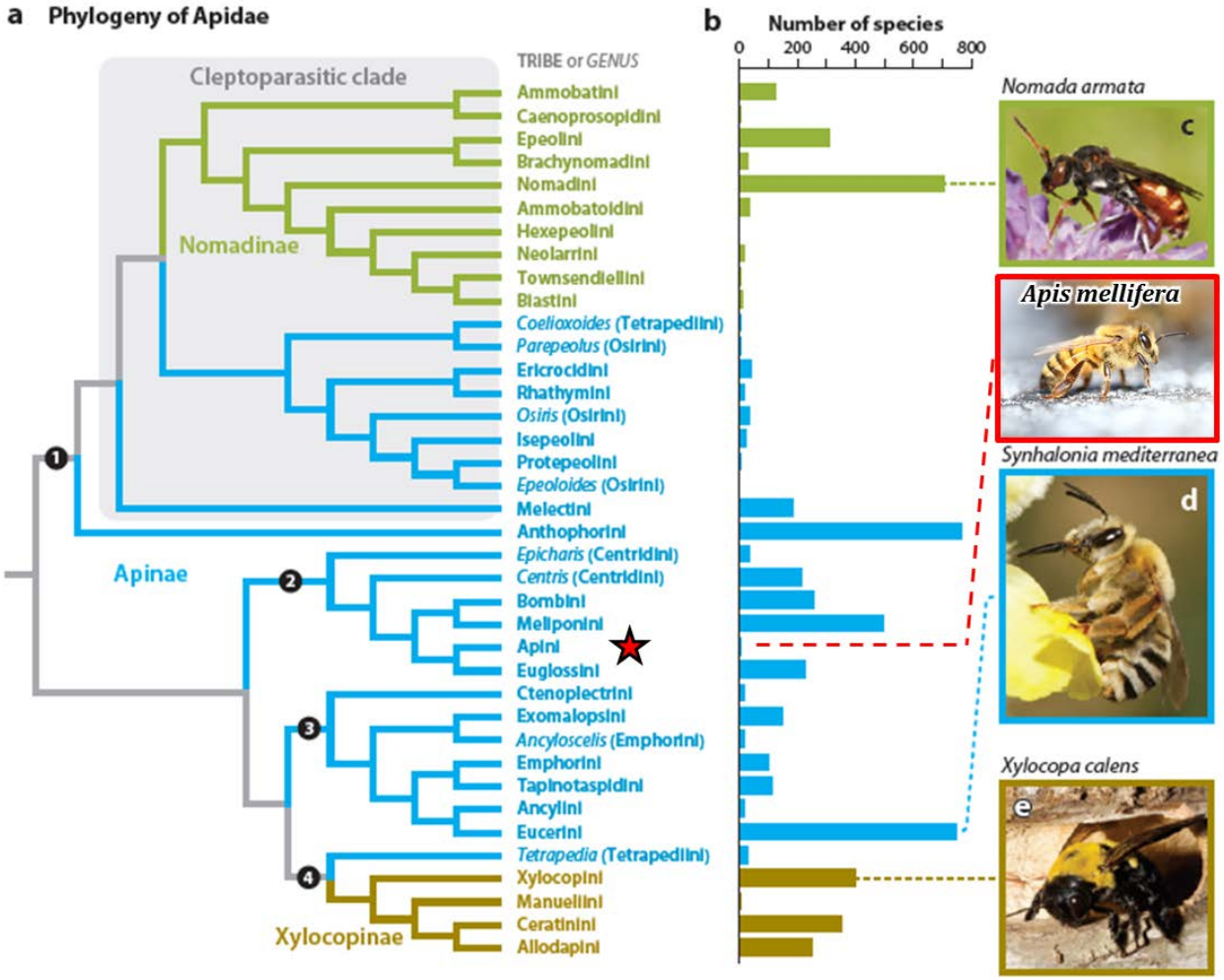


Figure I-19 : a) Phylogénie de la sous-famille, tribu et genre des abeilles *Apidae*. b) Histogramme indiquant le nombre d'espèces décrites pour chaque groupe. En rouge, position phylogénétique de l'abeille *A. mellifera*. *Source* : modifié d'après Danforth *et al.* (2013).

environ 140 à 110 millions d'années (Danforth *et al.*, 2013). Près de 20 000 espèces d'abeilles sont répertoriées, dont 15 000 espèces sont retrouvées dans les Néo tropiques contre seulement 2 500 en Europe (Moure *et al.*, 2007, Klinger, 2009, Michener, 2000). La radiation des abeilles coïnciderait avec celle de l'apparition et du début de la diversification des angiospermes (près de 250 000 espèces) (Danforth *et al.*, 2006). Ces deux groupes ont développé une coévolution où les abeilles pollinisatrices interviennent dans le système de reproduction des angiospermes en échange de ressources alimentaires (Michener, 2000). Au sein des abeilles, la famille des *Apidae* est la plus grande et regroupe plus de 5700 espèces incluant l'abeille *Apis mellifera* (tribu des *Apini*) (Ascher and Pickering, 2012) (Figure I-19). Le genre *Apis* comprend dix espèces d'abeilles qui sont réparties sous des climats très différents (Ruttner, 1988, Engel, 1999). Au sein de ce genre, l'abeille *A. mellifera* est la seule espèce dont l'aire d'origine n'est pas restreinte à l'Asie (Ruttner, 1988). Cette espèce est considérée indigène de l'Afrique, du Moyen-Orient, de l'Europe et d'une partie de l'Asie de l'Ouest (De la Rúa *et al.*, 2009, Sheppard and Meixner, 2003). La divergence entre *Apis mellifera* et *Apis cerana* a été estimée il y a 6 à 8 millions d'années sur la base de données génétiques (Cornuet and Garnery, 1991, Garnery *et al.*, 1991, Arias and Sheppard, 2005).

L'étude des variabilités morphologiques et génétiques détectées au sein d'*Apis mellifera* a donné lieu à plusieurs scénarios évolutifs. L'origine géographique de l'espèce ainsi que les voies de colonisation sont encore discutées. Se basant sur la morphologie et la répartition géographique des sous-espèces, Ruttner *et al.* (1978) propose une origine d'*A. mellifera* au Moyen Orient, depuis laquelle l'espèce aurait colonisé l'Europe *via* deux routes : une route directe vers l'est de l'Europe et une autre passant par l'Afrique et la péninsule ibérique (Figure I-20i). Sur la base de l'analyse de la région intergénique COI-COII (Cytochrome oxydase I et II) de l'ADN mitochondrial, Garnery *et al.* (1992) s'accorde sur la proposition du centre d'origine de l'abeille domestique mais proposa une expansion par des routes de colonisation vers l'Europe ne passant pas par l'Afrique (Figure I-20ii). Enfin plus tard, l'étude de Whitfield *et al.* (2006) basée sur plus de 1000 SNPs répartis sur l'ensemble du génome, s'accorda avec la proposition d'une origine africaine, premièrement proposée par Wilson (1971), puis suggéra une colonisation de l'Europe par la

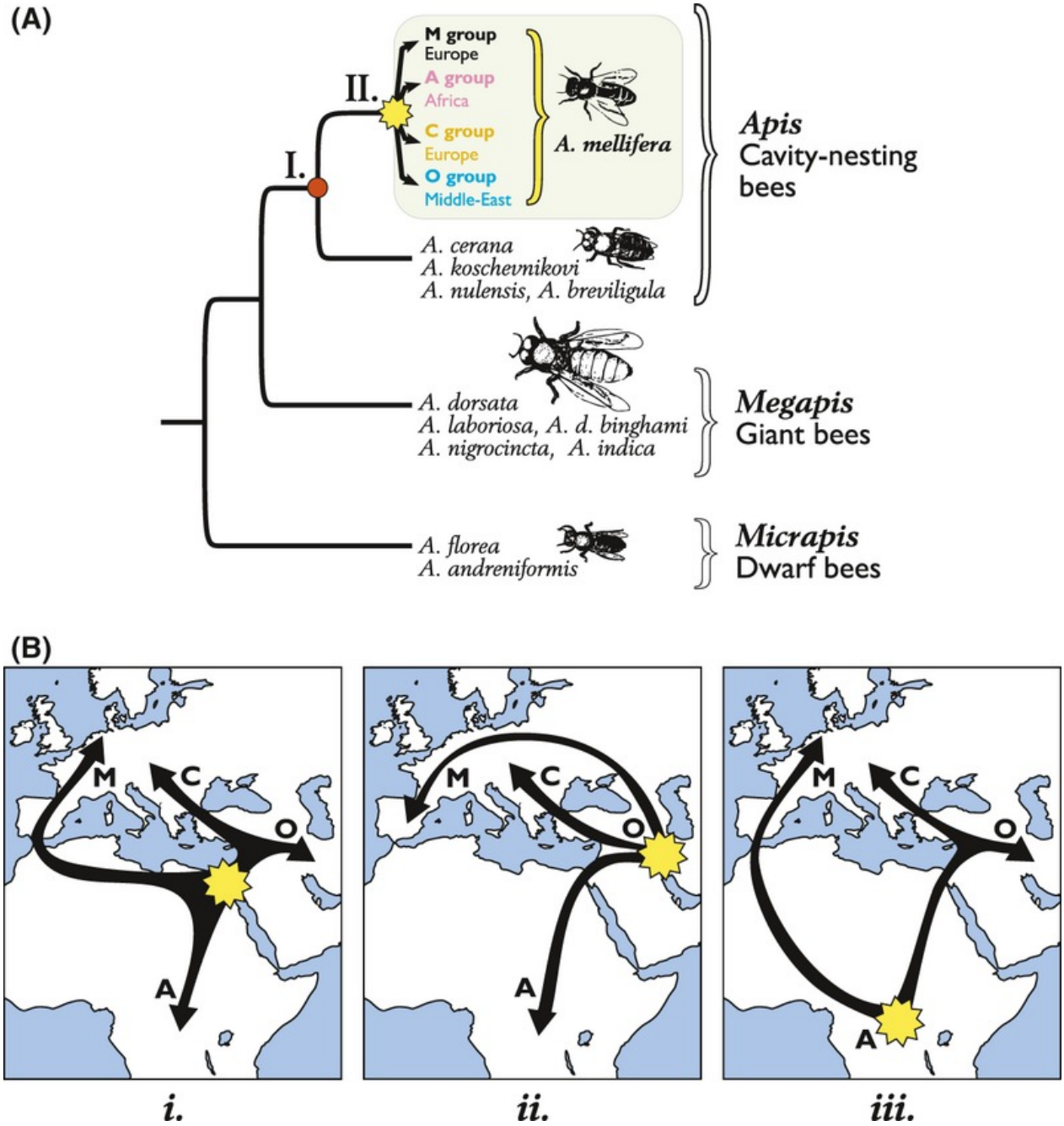


Figure I-20 : Différents scénarios évolutifs hypothétiques de l'origine de l'abeille *A. mellifera*. Scénario i) proposé par Ruttner *et al.* (1978) sur la base des analyses morphométriques suggérant une origine au Moyen Orient et plusieurs routes de colonisation de l'Europe, ii) proposé par Garnery *et al.* (1992) sur la base de données mitochondriales avec une origine au Moyen Orient et des routes de colonisation vers l'Europe n'impliquant pas un passage par l'Afrique et iii) un scénario avec une origine africaine soutenue par les données SNPs de Whitfield *et al.* (2006). *Source :* (Han *et al.*, 2012).

péninsule ibérique et un autre évènement passant par le Moyen Orient (Figure I-20iii). Toutefois, cette origine reste incertaine étant donné que le genre *Apis* est originaire d'Asie. L'étude de Han *et al.* (2012) remet en question l'hypothèse de l'origine africaine en analysant différemment les données SNPs et propose de potentielles origines en Asie ou encore en Europe.

4.2. Détermination et distribution des sous-espèces d'*A. mellifera*

L'abeille mellifère possède une étonnante plasticité écologique, lui permettant d'occuper une variabilité d'habitats comme les oasis du désert africain (Shaibi and Moritz, 2010), les montagnes alpines (Le Conte and Navajas, 2008), les dômes volcaniques éthiopiens (Meixner *et al.*, 2011), la bordure de la toundra (Toullec, 2008), les forêts tropicales africaines (Fletcher, 1978, Hepburn and Radloff, 1998) ou encore de nombreuses îles océaniques tempérées (De la Rúa *et al.*, 1998, De la Rúa *et al.*, 2001b, De la Rúa *et al.*, 2006, Carreck, 2008) et tropicales (Ralalaharisoa-Ramamonjisoa *et al.*, 1996, Franck *et al.*, 2001, Rasolofoarivao *et al.*, 2015).

Les populations d'*Apis mellifera* ont divergé par leur éloignement géographique mais aussi de l'occupation de niches très différentes entraînant des adaptations locales. L'alternance des périodes de glaciations et de réchauffements climatiques a contribué à l'isolement géographique de certaines populations. Sur la base de critères géographiques, morphologiques et comportementaux, les divergences ont mené à une sous-spéciation d'*A. mellifera* (Ruttner *et al.*, 1978) (Tableau I-1). Néanmoins, les différences morphologiques entre ces sous-espèces ne sont pas suffisantes pour créer un isolement reproducteur entre les différentes populations dites géographiques.

Sur la base de critères morphométriques, Ruttner (1988) identifie 24 sous-espèces. Toutefois, la révision taxonomique du genre *Apis* par Engel (1999) suggère qu'il y aurait 27 sous-espèces valides sur la base de la morphologie (sur plus de 90 descriptions morphologiques). Cette révision montre que certaines sous-espèces ne constitueraient que des écotypes[2] comme le cas d'*A. m. major* (écotype d'*A. m. intermissa*).

[2] Différents morphes au sein d'une même sous-espèce ou espèce résultant d'une adaptation à des habitats différents

Table I-1 : Liste des 28 sous-espèces d'*Apis mellifera* décrites et valides sur la base de critères morphologiques et indication de leur appartenance à une lignée évolutive (A : africaines, M et C : européennes et O : orientale) ou sous-groupe Z (sous-lignée A) sur la base de l'analyse morphométrique, de l'ADN mitochondrial ou du génome. *Source* : selon Ruttner (1988), Engel (1999), Sheppard and Meixner (2003), Ilyasov *et al.* (2011) et Meixner *et al.* (2011).

	Descripteur	Morphologie	ADNmt	SNPs
Afrique tropicale				
A. m. adansonii	(Latreille, 1804)	A	A	A
A. m. capensis	(Eschscholtz, 1822)	A	A	A
A. m. jemenitica	(Ruttner, 1976)	A	A/Y/Z	-
A. m. lamarckii	(Cockerell, 1906)	A	Z	A
A. m. litorea	(Smith, 1961)	A	A	A
A. m. monticola	(Smith, 1961)	A	A	-
A. m. scutellata	(Lepeletier de Saint Fargeau, 1836)	A	A	-
A. m. unicolor	(Latreille, 1804)	A	A	A
Afrique du nord-est				
A. m. intermissa	(Maa, 1953)	M	A	A
A. m. sahariensis	(Baldensperger, 1932)	M/A	A	-
A. m. simensis	(Meixner *et al.*, 2011)	A	A/Y	-
Ouest de la Méditérannée				
A. m. iberiensis	(Skorikov, 1929; renamed by Engel 1999)	M	M/A	M
A. m. mellifera	(Linnaeus, 1758)	M	M	M
Méditérannée centrale – Europe du Sud-Ouest				
A. m. carnica	(Pollmann, 1879)	C	C	C
A. m. carpatica	(Foti *et al.*, 1965)	-	-	-
A. m. cecropia	(Kiesenwetter, 1860)	C	C	-
A. m. ligustica	(Spinola, 1806)	C	C/M	C
A. m. macedonica	(Ruttner, 1988)	C	C	-
A. m. ruttneri	(Sheppard *et al.*, 1997)	M/A	A	-
A. m. siciliana	(Grassi, 1881)	C/A	A	-
Moyen Orient				
A. m. adami	(Ruttner, 1975)	C/O	C	-
A. m. anatoliaca	(Maa, 1953)	O	C/Z	O
A. m. caucasia	(Pollmann, 1889)	O	C	O
A. m. cypria	(Pollmann, 1879)	C	C/Z	-
A. m. meda	(Skorikov, 1929)	O	Z	-
A. m. remipes	(Gerstäcker, 1862)	O		-
A. m. syriaca	(Skorikov, 1929)	A/O	Z	O
Asie centrale				
A. m. pomonella	(Sheppard et Meixner 2003)	O	C/Z	O

Au fur et à mesure, de nouvelles sous-espèces ont été décrites comme *A. m. pomonella* au Kazakhstan (Sheppard and Meixner, 2003) et *A. m. simensis* en Ethiopie (Meixner *et al.*, 2011). Le développement des outils moléculaires a permis de valider la différenciation morphologique entre ces sous-espèces mais remet aussi en cause certaines déterminations. L'étude génétique (gène mitochondrial ND2) d'Ilyasov *et al.* (2011) suggère que *A. m. sossimai* nouvellement décrite par Engel (1999), n'est pas une nouvelle sous-espèce mais serait un écotype d'*A. m. macedonica*. L'inverse a aussi été observé avec le cas d'*A. m. carpatica* considérée comme un écotype d'*A. m. macedonica* par Ruttner (1988) et a été réintégrée au rang de sous-espèce par l'analyse du gène de détermination sexuel *csd* de Wang *et al.* (2012). De même, certaines sous-espèces comme *A. m. artemisa ou A. m. taurica* nécessiteraient des révisions taxonomiques intégrant les outils moléculaires à la morphométrie (Ilyasov *et al.*, 2011, Meixner *et al.*, 2013).

Pour ces raisons, le nombre de sous-espèces d'*A. mellifera* varie d'un auteur à l'autre et 28 ont été identifiées ici comme étant encore valides en considérant une divergence à la fois morphologique et génétique (Tableau I-1). Selon les données moléculaires, la divergence entre les sous-espèces aurait été datée entre 0,7 et 1,3 millions d'années avec les études de l'ADN mitochondrial (Garnery *et al.*, 1992, Arias and Sheppard, 2005) tandis que l'étude du génome complet de certaines sous-espèces suggérerait une différenciation plus récente entre 13 000 à 38 000 ans (Wallberg *et al.*, 2014).

Dans l'Ouest de l'Europe, on retrouve l'abeille noire *A. m. mellifera* et l'abeille ibérique *A. m. iberiensis* (anciennement nommé *iberica*). *A. m. iberiensis* (Engel, 1999) est indigène de la péninsule ibérique, des îles Baléares et Atlantique (De la Rúa *et al.*, 1998, Radloff *et al.*, 2001). Les Pyrénées auraient joué le rôle de barrière géographique restreignant les échanges entre les populations du Nord de l'Europe avec celles de l'Espagne-Portugal (Miguel *et al.*, 2007). Ainsi *A. m. iberiensis* se serait différenciée des populations de l'abeille noire *A. m. mellifera*, naturellement distribuée depuis la France jusqu'en Scandinavie, et s'étendant vers la Russie (Meixner *et al.*, 2007) (Figure I-21).

Figure I-21 : Carte de la distribution géographique des 28 sous-espèces reconnues d'*A. mellifera* dans son aire de répartition naturelle avec indication de la répartition des lignées évolutives A, C, M, O et du sous-groupe Z (sous-lignée africaine mais divergente des 4 lignées évolutives au niveau nucléaire). *Source* : modifié d'après Ruttner (1988), Engel (1999), Franck *et al.* (2001), (Alburaki *et al.*, 2013). *Source du fond de carte :* Open Layer Landscape.

Concernant la présence de l'abeille noire, *A. m. mellifera,* sur les îles Britanniques, des preuves biologiques, historiques et archéologiques indiquent qu'elle serait établie depuis au moins 4000 ans (Carreck, 2008).

Dans le reste de l'Europe, la sous-espèce *A. m. carnica* est naturellement distribuée au centre et à l'Est des pays européens comme en Slovénie et en Croatie (Muñoz *et al.*, 2009). La sous-espèce *A. m. ligustica* est indigène d'Italie tandis qu'*A. m. siciliana* (anciennement nommée *sicula*) occupe la Sicile (Dall'Olio *et al.*, 2007, Franck *et al.*, 2000a). En Grèce et dans les îles alentours, plusieurs sous-espèces ont été décrites morphologiquement et génétiquement dont *A. m. macedonica*, *A. m. cecropia*, *A. m. cypria*, *A. m. adami* (Meixner *et al.*, 2013). Certaines sous-espèces ont été décrites mais n'ont fait l'objet que de peu d'études comme c'est le cas *A. m. ruttneri* uniquement décrite sur des critères morphométriques sur l'île de Malte (Sheppard *et al.*, 1997).

Au niveau du Moyen Orient, quatre sous-espèces ont été décrites comme naturellement présentes en Turquie : *A. m. anatoliaca*, *A. m. caucasica*, *A. m. meda* et *A. m. syriaca* et ont été confirmées comme morphologiquement et génétiquement différentes (Kandemir *et al.*, 2000). *A. m. remipes* (anciennement nommée *A. m. armeniaca)* a été décrite comme naturellement présente en Arménie (Ruttner, 1988, Engel, 1999).

La découverte d'*A. m. pomonella* par Sheppard and Meixner (2003) en Asie centrale a permis d'élargir l'aire naturelle de l'abeille domestique. Toutefois, les connaissances sur cette sous-espèce sont limitées car elle n'a fait l'objet que d'une seule étude conjuguant la morphométrie et l'utilisation du gène mitochondrial ND2.

Enfin en Afrique, un total de 11 sous-espèces ont été décrites à ce jour (Engel, 1999, Ruttner, 1988, Meixner *et al.*, 2011, Hepburn and Radloff, 1998). Au Nord de l'Afrique, *A. m. intermissa* est naturellement présente dans la région marocaine et tunisienne, et *A. m. sahariensis* se retrouve dans le Sud de l'Algérie où certaines de ces populations restent très « préservées » génétiquement (Bendjedid and Achou, 2014, Chahbar *et al.*, 2013, Shaibi and Moritz, 2010). La sous-espèce *A. m. lamarckii* est quant à elle distribuée en Egypte.

Planche 1: ***Apis mellifera unicolor*** **(Latreille, 1804) -** (ouvrière, La Réunion). (Photographies Antoine FRANCK/CIRAD)
a. ouvrière en vue dorsale (ailes étalées); **b.** aile antérieure et postérieure droite; **c.** système de couplage de l'aile antérieure; **d.** ouvrière en vue dorsale; **e.** ouvrière en vue latérale; **f.** thorax et tête en vue latérale; **g.** tête en vue latérale; **h.** pièces buccales; **i.** tête vue de face; **j.** ocelles; **k.** corbeille sur patte antérieure; **l.** peigne

Toujours dans le Nord de l'Afrique, la sous-espèce *A. m. jemenitica* possède une aire de distribution assez large s'étendant jusqu'au Tchad, en Arabie Saoudite, en Somalie, au Soudan, au Yémen et en Oman (Figure I-21). *A. m. adansonii* est la sous-espèce à la plus large aire de distribution couvrant tout l'Ouest de l'Afrique depuis le Sénégal en passant par le Nigéria jusqu'au bassin du Congo, et comprenant aussi les îles proches telles que São Tomé et Principe (Fletcher, 1978). Plus au sud, ce sont les sous-espèces *A. m. litorea* (plutôt distribuée sur la côte Est africaine, du Kenya au Mozambique) et *A. m. monticola* (naturellement présente dans les forêts montagneuses comme celles du Mont Kilimandjaro) qui sont décrites (Meixner *et al.*, 1989, Gruber *et al.*, 2013). En 2011, une nouvelle sous-espèce *A. m. simensis* est décrite en Ethiopie sur la base de 38 caractères morphologiques et est différenciée des populations des autres sous-espèces sympatriques (Meixner *et al.*, 2011). *A. m. scutellata* se distribue au niveau de l'Afrique du Sud, du Zimbabwe, du Botswana, de la Namibie et remonte aussi en Somalie. Cette sous-espèce est en contact avec *A. m. capensis* dont la distribution se restreint au niveau du Cap en Afrique du Sud (Franck *et al.*, 2001, Hepburn *et al.*, 1994, Hepburn and Radloff, 1998, Hepburn *et al.*, 1998). Enfin, *A. m. unicolor* a été décrite comme endémique de Madagascar (Figure I-21 et Planche 1).

Si la distribution géographique des sous-espèces semble bien décrite en Europe, la délimitation de leur aire naturelle est moins bien connue en Afrique. L'étude de la diversité génétique des lignées et des populations a permis de montrer la complexité de l'évolution au sein de cette espèce notamment du fait que les sous-espèces sont parfois peu différenciées et peuvent s'hybrider.

4.3. Lignées évolutives et diversité mitochondriale

Les sous-espèces d'*A. mellifera* ont d'abord été classées en quatre branches évolutives par l'étude de la morphométrie de Ruttner (1988) des caractères tels que la couleur de l'abdomen, la pilosité abdominale, la longueur de la langue, l'indice cubital ou encore la transgression discoïdale (Figure I-21 et I-22).

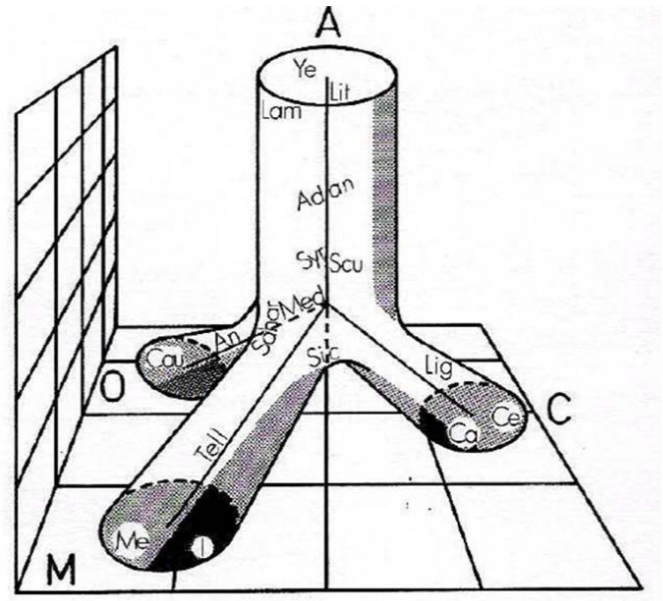
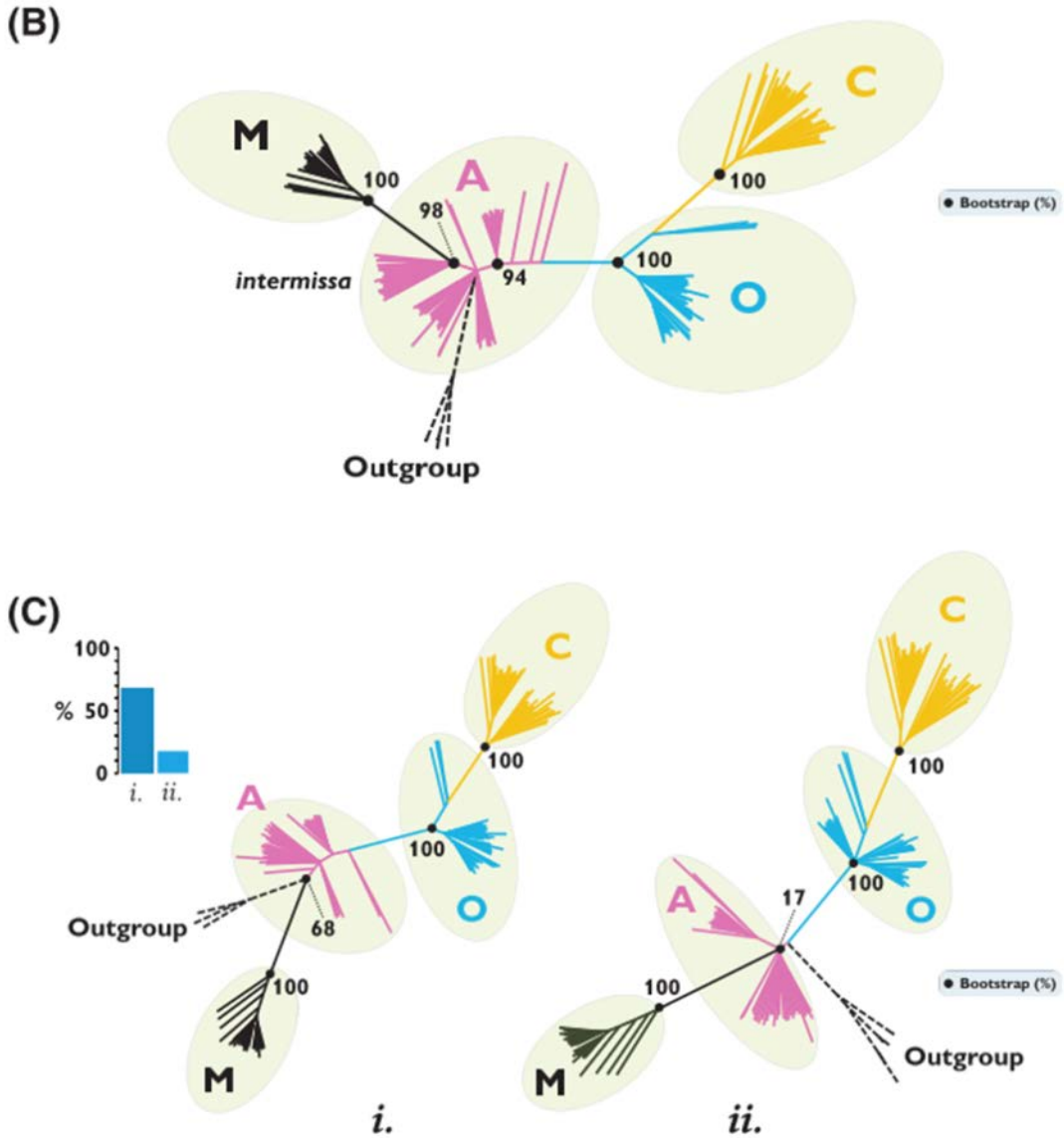


Figure I-22 : Phénogramme tridimensionnel des branches évolutives d'*A. mellifera* obtenu après analyses de la morphométrie de plusieurs sous-espèces selon Ruttner (1988).



Ces quatre branches ont été définies en un groupe africain A (Afrique tropicale et atlantique), deux groupes européens M et C (respectivement Nord et Ouest-méditerranéens) et un groupe oriental O (Proche Orient). La discrimination morphologique des sous-espèces a même pu être confirmée en n'utilisant que les caractères alaires (20 points repères sur l'aile supérieure) (Kandemir *et al.*, 2011). Le développement de la biologie moléculaire et l'utilisation de marqueurs mitochondriaux ont permis de confirmer que ces groupes constituaient des lignées évolutives bien distinctes génétiquement (Garnery *et al.*, 1992). Cette divergence évolutive a été confirmée à l'aide de marqueurs microsatellites nucléaires et l'utilisation conjointe de ces marqueurs et des marqueurs mitochondriaux a même permis de révéler un autre sous-groupe africain : la lignée Z (Alburaki *et al.*, 2013, Alburaki *et al.*, 2011). Plus récemment, les marqueurs SNPs et l'approche génomique chez l'abeille mellifère ont aussi étayé cette classification intraspécifique (Whitfield *et al.*, 2006, Han *et al.*, 2012, Wallberg *et al.*, 2014) (Figure I-23 et I-24).

La détermination des lignées évolutives chez *A. mellifera* est standardisée et s'effectue par l'étude du polymorphisme de la région intergénique non codante des gènes COI-COII de l'ADN mitochondrial[3] (ADNmt) (Cornuet and Garnery, 1991, Garnery *et al.*, 1992, Meixner *et al.*, 2013). De par l'absence ou la faible fréquence de recombinaison, les mutations (non délétères si elles se produisent dans des portions codantes) s'accumulent dans la molécule et sont particulièrement intéressante dans les études de phylogénie. Chez les abeilles, de par le mode de transmission de la mitochondrie exclusivement maternel, il est possible de retracer les origines maternelles ancestrales.

🡐 **Figure I-23 :** Arbres basés sur les données SNPs de Whitfield *et al.* (2006) construits avec la méthode Neighbor joining avec en B) un enracinement de l'arbre en Afrique (lignée évolutive A) et en C) deux autres propositions d'arbres très bien soutenus par les bootstraps, suggérant que l'*outgroup* se positionne dans le groupe de la lignée évolutive européenne M (i) ou entre les groupes A-M et C-O (ii). *Source* :(Han *et al.*, 2012).

[3] La mitochondrie est un organite présent chez tous les eucaryotes et serait le résultat d'une endosymbiose avec une eubactérie (Lang et al., 1999, Gray et al., 2001). Cet organite est nécessaire à la respiration cellulaire permettant de générer de l'énergie sous forme d'ATP et est donc est abondant dans les cellules eucaryotes. La mitochondrie contient de l'ADNmt qui est une moléculaire circulaire, double brin de petite taille (Boursot and Bonhomme, 1986).

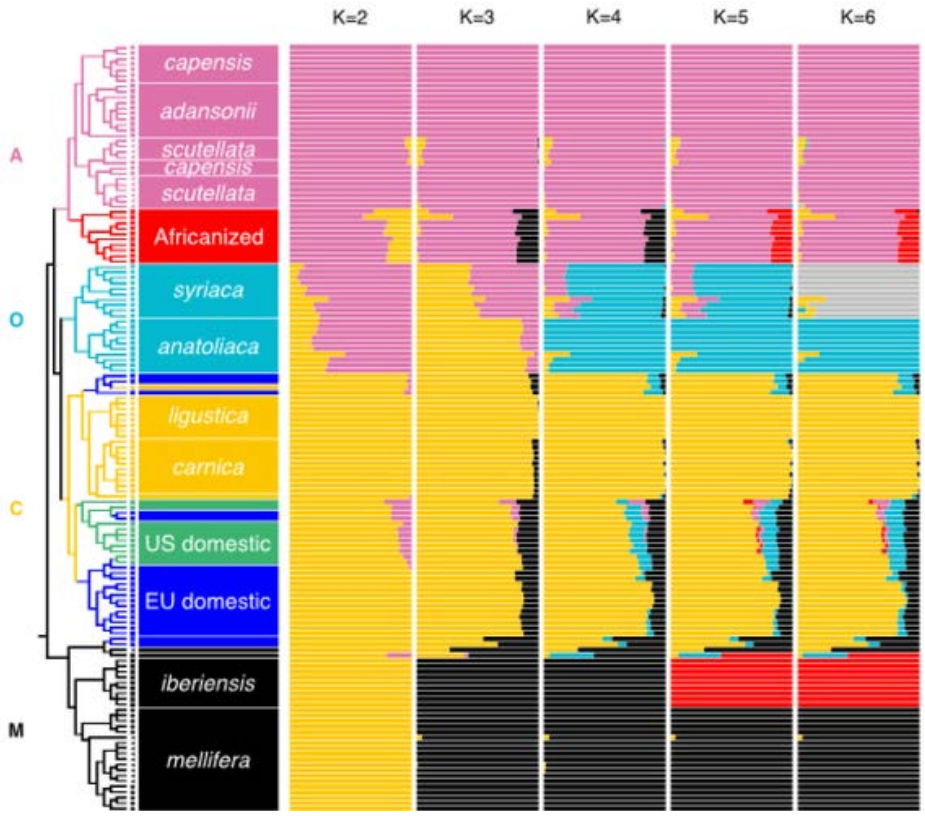


Figure I-24 : Représentation des relations génétiques entre des lignées évolutives, sous-espèces et populations d'abeilles (indigènes ou introduites) avec un arbre phylogénétique et des analyses bayésiennes de *clustering* (STRUCTURE) sur la base de 8,3 millions de SNPs identifiés avec le séquençage de 140 génomes complets mettant en évidence la divergence des lignées évolutives, sous-espèces et phénomènes d'hybridations. *Source* : Wallberg *et al.* 2014.

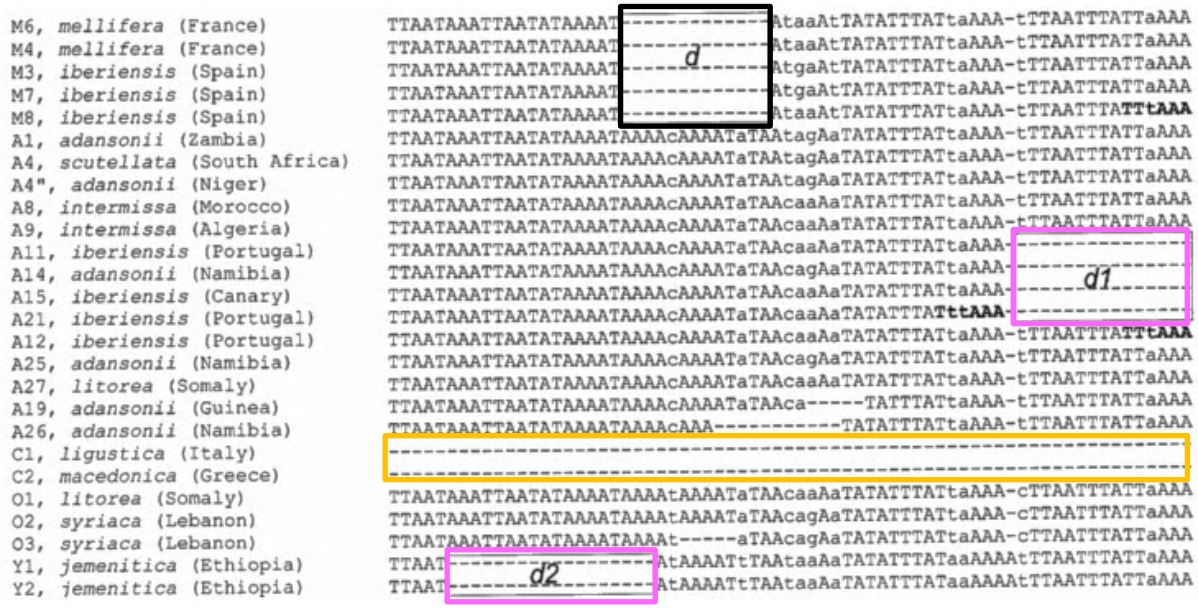


Figure I-25 : Variabilité nucléotidique au sein de la séquence P chez plusieurs sous-espèces d'*Apis mellifera.* Les séquences sans délétions sont nommées P_0 et sont caractéristiques de la lignée A présente en Afrique tropicale ; les délétions « *d* » sont caractéristiques de la séquence P présente dans les populations de lignée M ; les délétions de type « *d1* » sont caractéristiques de la séquence P_1 détectée dans les populations de lignée africaine ; les délétions de type « *d2* » ne sont présentes que dans les lignées maternelles Y ; enfin les individus ne présentant pas de séquence P sont caractéristiques de la lignée C. *Source :* (Franck *et al.*, 2001).

Au sein du genre *Apis*, la région intergénique COI-COII montre une variabilité de longueur importante, allant de 24 pb chez *Apis dorsata* à plus de 1000 pb chez *A. mellifera* (Cornuet and Garnery, 1991, Cornuet *et al.*, 1991). Parmi les nombreuses méthodes utilisées pour étudier le polymorphisme de cette région, le test de PCR-RFLP utilisant l'enzyme de restriction *DraI* s'est avéré suffisamment résolutif pour détecter rapidement la lignée évolutive présente (A, C ou M), voire même la sous-espèce (Garnery *et al.*, 1993). En revanche, cette méthode ne permet pas de différencier la lignée O de la lignée C (Cornuet and Garnery, 1991). La méthode consiste d'abord à amplifier la région intergénique COI-COII avec des amorces s'hybridant au niveau de l'ARNt$_{Leu}$ dans le sens du cadre de lecture et en position 5' du gène COII en *reverse*. Suite à cela, une restriction enzymatique est réalisée sur l'amplicon avec l'enzyme *DraI* dont les sites de restrictions sont 5'-TTTAAA-3'(RFLP). En visualisant le nombre et la taille des fragments de restrictions, il est possible de déterminer la lignée maternelle par l'inférence de la composition de la région intergénique. Cette région est composée de deux types de séquences : P (entre 52 à 69 pb) et Q (entre 192 et 196 pb) (Garnery *et al.*, 1993). La séquence de type P est la seule à présenter une variabilité liée à l'appartenance à une lignée évolutive.

Les séquences d'ADNmt A provenant de l'Afrique tropicale sont caractérisées par la présence d'une séquence de type P_0 (67 bp) (Figure I-25 et I-26) et se différencient des séquences A atlantique présentant une délétion de 15 pb sous la forme d'une séquence P_1. En plus d'une unité de séquence P, les séquences africaines peuvent présenter jusqu'à trois répétition de séquence Q (Alattal *et al.*, 2014, Alburaki *et al.*, 2011, Franck *et al.*, 2001). En revanche, les lignées européennes M sont caractérisées par une séquence P tandis que celles de la lignée C ne possèdent qu'une seule répétition de séquence Q et aucune séquence P (Cornuet and Garnery, 1991, Garnery *et al.*, 1993) (Figure I-25 et I-26). L'utilisation systématique de la PCR-RFLP *DraI* a permis d'avoir pour chaque lignée évolutive une liste de profils de restriction COI-COII dont la nomenclature a été définie par Garnery *et al.* (1993). Cette méthode a permis de montrer que certaines sous-espèces étaient d'origines hybrides ou issues d'une mise en contact secondaire et de ce fait possédaient des lignées mitochondriales d'origines différentes.

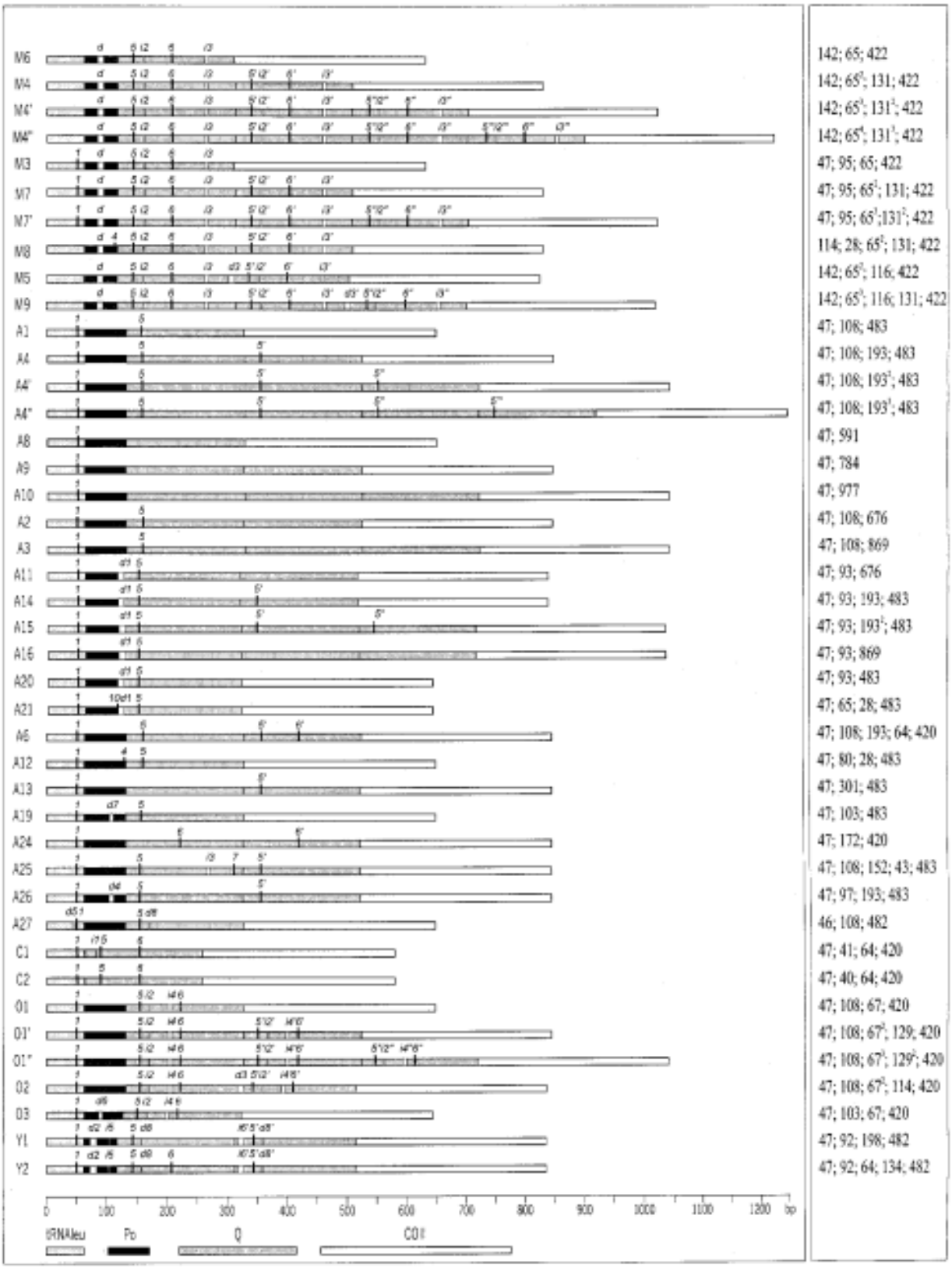


Figure I-26 : Exemple de variabilité de de la région intergénique COI-COII de l'ADN mitochondrial chez l'abeille domestique avec profils de restriction obtenus par la PCR-RFLP *DraI*. *Source :* (Franck *et al.,* 2001).

Ces zones de contact entre deux lignées évolutives divergentes ont été confirmées également par des marqueurs nucléaires comme chez *A. m. ligustica* (lignées M et C), *A. m. siciliana* (lignées A et C) (Franck *et al.*, 2000a, Muñoz *et al.*, 2014a) ou encore *A. m. iberiensis* (lignées A et M) (Chávez-Galarza *et al.*, 2015, Garnery *et al.*, 1998a, Miguel *et al.*, 2007).

Toutefois, la visualisation des fragments de restrictions sur gel ne permet pas de détecter la diversité réelle des haplotypes qui varient aussi bien de par leur site de restriction, taille et composition nucléotidique. Grâce à la baisse des prix du séquençage, la diversité de cette région a pu être étudiée plus en détail. Rortais *et al.* (2011) ont recensé les études utilisant cette région COI-COII qui ont permis de décrire 91 haplotypes de la lignée M sur l'analyse de 6 633 colonies, 30 haplotypes de la lignée A sur 1 745 colonies analysées, 5 haplotypes de la lignée C dans 1 621 colonies et 7 haplotypes pour la lignée O sur 83 colonies. Depuis, le séquençage de 20 colonies sur 950 échantillonnées de la côte atlantique de la péninsule ibérique a permis l'implémentation de 16 nouveaux haplotypes A (Pinto *et al.*, 2012). Il est intéressant de noter qu'il existe un déséquilibre de connaissance de la diversité mitochondriale au sein des lignées évolutives. La diversité mitochondriale de la lignée africaine tropicale est très mal connue et presque toutes les séquences reportées proviennent de l'étude de (Franck *et al.*, 2001). Le reste des séquences de lignée A disponibles sur la base de données GenBank proviennent de populations introduites et dérivées des croisements d'*A. m. scutellata* avec d'autres sous-espèces européennes (Magnus and Szalanski, 2010, Magnus *et al.*, 2011, Magnus *et al.*, 2014, Szalanski and Magnus, 2010).

Le séquençage de la région intergénique COI-COII a permis de mettre en évidence une confusion existante entre la lignée mitochondriale O et morphologique O (Franck *et al.*, 2001) qui correspondrait en fait à la sous-lignée africaine Z. Cette hypothèse a été confirmé par des analyses microsatellites (Alburaki *et al.*, 2011, Alburaki *et al.*, 2013) (Figure I-27). Enfin une lignée mitochondriale yéménite Y aurait été détectée la PCR-RFLP *DraI* et le séquençage de la région COI-COII (Franck *et al.*, 2001) mais ne constituerait probablement qu'un sous-groupe africain (Kandemir *et al.*, 2006).

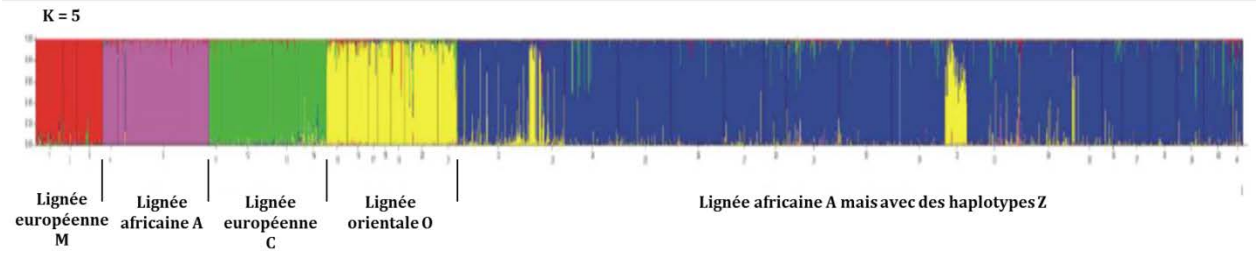


Figure I-27 : Structure génétique des populations du Moyen Orient (Syrie, Liban, et Iraq) de la sous-lignée Z au regard d'échantillons des lignées évolutives A, C, M et O. Le graphe montre que chaque lignée est assignée à un groupe génétique différent (couleur) et se base sur l'analyse de 14 microsatellites nucléaires. *Source :* (Alburaki *et al.*, 2013)

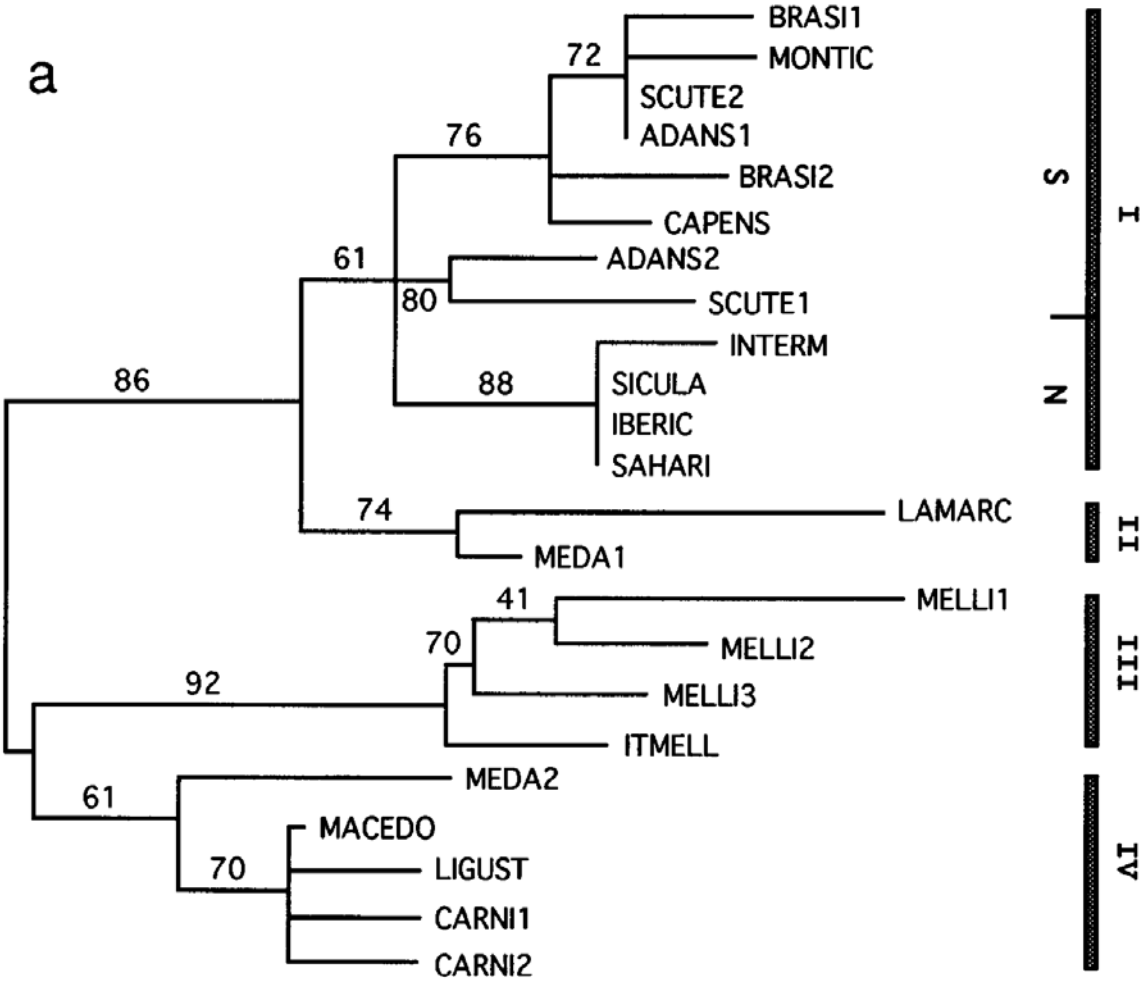


Figure I-28 : Arbre phylogénétique non enraciné des séquences ND2 basé sur la méthode Neibourg-Joining chez 14 sous-espèces de l'abeille *A. mellifera*. CARN : *A. m. carnica*, ITMELL : *A. m. ligustica*, MACEDO : *A. m. macedonica*, MELLI : *A. m. mellifera*, MEDA : *A. m. meda*, ADANS : *A. m. adansonii*, CAPENS : *A. m. capensis*, IBERIC : *A. m. iberiensis*, INTERM : *A. m. intermissa*, LAMRCK : *A. m. lamarckii*, MONTIC : *A. m. monticola*, SAHARI : *A. m. sahariensis*, SCUTE : *A. m. scutellata* et SICULA : *A. m. siciliana*. *Source* : (Arias and Sheppard, 1996).

La région intergénique COI-COII permet d'identifier les lignées évolutives, mais ne permet pas de différencier clairement les sous-espèces. Si *A. m. ligustica* et *A. m. carnica* possèdent des haplotypes caractéristiques (respectivement C1 (Franck *et al.*, 2000a) et C2 (Muñoz *et al.*, 2009)) ce n'est pas le cas de toutes les sous-espèces. Certains haplotypes sont communs à des populations de sous-espèces proches géographiquement, comme pour *A. m. iberiensis* et *A. m. mellifera* (Garnery *et al.*, 1998a), voire éloignées comme en Afrique où les haplotypes A1 et A4 sont communs à des populations du Nord et du Sud (Franck *et al.*, 2001). Aussi un autre marqueur mitochondrial a été développé chez l'abeille se situant dans la région codante du gène ND2[4] (Arias and Sheppard, 1996). Le fait que cette région soit codante implique que les mutations sont soumises à sélection et que leur accumulation est moins rapide que dans une région intergénique non-codante COI-COII. Ce marqueur a certes été moins utilisé que la région intergénique COI-COII, mais il a permis de différencier les sous-espèces d'*A. mellifera* (Arias and Sheppard, 1996, Ilyasov *et al.*, 2011, Kandemir *et al.*, 2006) (Figure I-28).

4.4. Systèmes de reproduction et hybridation

L'abeille *A. mellifera* est une espèce eusociale vivant dans des colonies monogynes[5] hiérarchisées selon trois castes (Wilson, 1971) (Figure I-29). Au sein d'une colonie cohabitent d'une part les sexués ; la reine (seule femelle reproductrice) et les mâles et d'autre part les individus stériles plus nombreux, qui sont communément nommés les ouvrières (Seeley, 2009, Wilson, 1971). En ce qui concerne la durée de vie, elle varie en fonction de la caste donnée. La durée de développement d'une reine est de 16 jours et peut vivre entre 1 à 8 ans (Page Jr and Peng, 2001). Un mâle se développe en 24 jours et vit en moyenne 20 à 40 jours tandis qu'une ouvrière se développe en 21 jours et peut vivre en moyenne 15 à 38 jours en été et 140 jours en hiver (Page Jr and Peng, 2001). Si la colonie est considérée comme un super-organisme alors le temps de génération équivaut à celui d'une reine, et est estimé à une moyenne de 2 ans (Excoffier *et al.*, 2005).

[4] Gène codant pour une des sous-unités de la NADH, nécessaire dans les réactions d'oxydoréduction de la formation d'ATP
[5] C'est-à-dire n'ayant qu'une seule femelle reproductrice dite reine

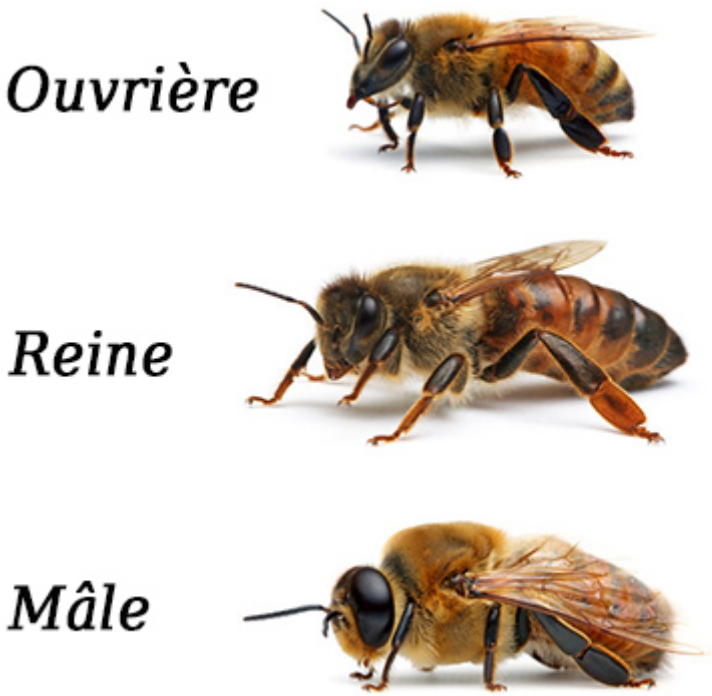


Figure I-29 : Dimorphisme sexuel et différences morphologiques entre les trois castes présentes dans une colonie d'abeille *Apis mellifera*. *Source :* http://www.mieldutarn.net

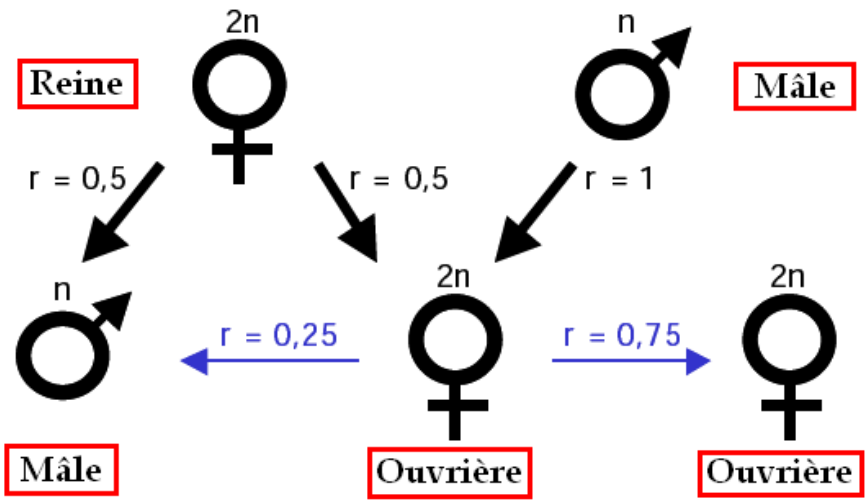


Figure I-30 : Schéma expliquant le système de parenté au sein des sociétés d'Hyménoptères haplo-diploïde. Le mâle (n) transmet l'intégralité de ses gènes à ses filles mais ne transmet jamais de gènes aux mâles de la génération suivante. La reine (2n) transmet la moitié de ses gènes à chacun des deux sexes. « r » est le coefficient de parenté entre deux individus *Source :* (Clémencet, 2006)

Le système de détermination des castes d'*A. mellifera* est haplo-diploïde et met en jeu des partenaires avec des niveaux de ploïdie différents (Bull, 1981). Les mâles sont issus d'ovules non fécondés et sont haploïdes (*n chromosome*) alors que les femelles proviennent d'œufs fertilisés et sont diploïdes (2*n chromosomes*) (Evans *et al.*, 2004, Palmer and Oldroyd, 2000) (Figure I-30). D'autre part, *A. mellifera* est une espèce polyandre, ce qui veut dire que les femelles se reproduisent avec plusieurs mâles différents au cours d'un vol nuptial (Palmer and Oldroyd, 2000). Ce type de comportement implique des coûts importants (dépense énergétique, prédation, parasitisme,…) mais augmente la diversité génétique intra-coloniale à laquelle serait associés plusieurs bénéfices (Palmer and Oldroyd, 2000, Zeh and Zeh, 2001, Girard *et al.*, 2011, Mattila and Seeley, 2007). Les mâles sexuellement matures se rassemblent en congrégation pouvant provenir de plusieurs centaines de colonies (Schlüns *et al.*, 2005, Koeniger *et al.*, 1979). Pour se reproduire, les reines vierges quittent leur colonie mère et vont rencontrer ces congrégations pour ensuite fonder leur propre colonie.

Les sous-espèces d'*A. mellifera* ne sont pas suffisamment divergentes pour établir un isolement reproducteur. Aussi ces sous-espèces sont capables de s'hybrider comme le cas de l'abeille africanisée du Nouveau Monde qui est issue des croisements entre la sous-espèce africaine *A. m. scutellata* et d'autres sous-espèces européennes telles que *A. m. mellifera*, *A. m. ligustica* ou encore *A. m. carnica* (Smith *et al.*, 1989, Sheppard *et al.*, 1991, Winston, 1994) (Figure I-24). L'abeille africanisée est aussi connue sous le nom d'abeille tueuse car elle est très agressive et pose un réel problème aux Etats-Unis et en Amérique latine (Winston, 1992, Michener, 1975, Schumacher *et al.*, 1989, Kono and Kohn, 2015). Cette capacité d'hybridation pose également des problèmes de conservation, où le patrimoine génétique de sous-espèces indigènes voire endémiques est menacé par l'importation de sous-espèces exotiques pour l'apiculture (Harpur *et al.*, 2013).

L'utilisation de marqueurs mitochondriaux permet de détecter les lignées évolutives mais la détection d'hybridation et d'introgression dans les populations est réalisée à partir de marqueurs nucléaires. Chez l'abeille domestique, 550 marqueurs microsatellites ont été développés dans le but d'étudier la diversité génétique et la structure populationnelle (Solignac *et al.*, 2003, Shaibi *et al.*, 2008). Ces microsatellites nucléaires ont été utilisés pour quantifier les niveaux d'introgression des sous-

espèces largement commercialisées *A. m. ligustica* et *A. m. carnica* notamment dans les populations d'*A. m. mellifera* (Jensen *et al.*, 2005a, Oleksa *et al.*, 2011) ou dans les populations insulaires d'*A. m. iberiensis* (Muñoz *et al.*, 2014b).

5. Objectifs de la thèse

Les objectifs de recherches de cette thèse étaient de caractériser la diversité et la structure génétique des populations d'abeille *Apis mellifera* dans les îles du Sud-Ouest de l'océan Indien (SOOI). Pour cela, nous avons opté pour une approche moléculaire permettant de i) retracer l'origine maternelle des colonies, à partir de deux séquences mitochondriales, l'une correspondant à la région intergénique COI-COII non-codante et l'autre correspondant à une région codante du gène ND2 et ii) d'étudier la structure des populations à partir de la diversité génétique nucléaire neutre (14 à 15 *loci* microsatellites). Afin de pouvoir positionner la diversité génétique de l'abeille du SOOI dans un contexte global, il a été nécessaire d'implémenter des populations d'origine insulaire de la zone (Madagascar), et continentales (Afrique et Europe). Ainsi nous avons pu comparer cette diversité aux populations de l'archipel des Mascareignes (La Réunion, Maurice, Rodrigues), des Seychelles (Mahé, Praslin, La Digue) et des Comores (Grande Comore, Anjouan, Mohéli, Mayotte).

Dans le **chapitre 1**, nous avons étudié la diversité génétique mitochondriale des abeilles de trois archipels du SOOI puis nous l'avons comparé à celle de Madagascar, ainsi qu'aux des populations continentales d'Afrique et d'Europe. Nous avons séquencé la région COI-COII non-codante pour déterminer précisément les lignées évolutives et sous-lignées présentes ; le gène ND2 nous a permis d'identifier la diversité des sous-espèces. L'étude de la structure de cette diversité nous a permis de mieux comprendre la colonisation des populations insulaires d'abeilles dans cette région.

Dans le **chapitre 2**, nous nous sommes attardés sur les populations d'abeilles de Rodrigues, que nous avons étudié à l'aide du marqueur mitochondrial (COI-COII) diagnostique des lignées évolutives d'abeille et de microsatellites. De plus, après voir caractérisé la diversité génétique de cette population insulaire, nous avons réalisé

une analyse d'inférence Bayésienne dans le but d'estimer la date du dernier goulot d'étranglement à l'origine de cette population actuelle.

Dans le **chapitre 3**, nous avons étudié plus en détail les niveaux de diversité génétique et la structure des populations à l'échelle de l'archipel des Seychelles (3 îles principales) en adoptant également l'utilisation de microsatellites et de la région d'ADNmt COI-COII.

Dans le **chapitre 4**, les principaux objectifs étaient i) de caractériser la diversité génétique nucléaire des populations d'abeilles de La Réunion et de Maurice via l'utilisation des mêmes marqueurs microsatellites, ii) de détecter si l'isolement géographique des populations a mené au patron commun de différenciation insulaire et enfin iii) de comparer la diversité génétique nucléaire des populations insulaires du SOOI à celle de populations continentales afin de détecter une éventuelle différenciation entre populations insulaires continentales.

Ouvrière butineuse d'A. mellifera sur fleur de Dombeya à La Réunion

II) Chapitre 1 : Diversité des lignées évolutives et sous-espèces d'abeilles dans les îles du Sud-Ouest de l'océan Indien††

Maéva Angélique Techer, Johanna Clémencet, Christophe Simiand, Bernard Reynaud, Delatte Hélène

Résumé

Les archipels du Sud-Ouest de l'océan Indien et Madagascar forment un point chaud de diversité avec de fort taux d'endémisme. Dans ces systèmes insulaires, l'abeille mellifère possède un rôle clé de par sa capacité de pollinisateur généraliste, mais est très peu étudiée. Pourtant plusieurs îles dont celles des archipels des Mascareignes, Seychelles et Comores abritent cette abeille. Dans cette zone, la sous-espèce *A. m. unicolor* a été décrite comme endémique de Madagascar et appartient à la lignée africaine. Par le passé, des introductions de sous-espèces européennes ont été reportées dans plusieurs des îles pour des besoins apicoles. Cependant, aucune donnée n'était disponible sur l'adaptation de ces abeilles introduites aux nouvelles conditions environnementales de type tropical.

Aussi, cette étude a cherché à déterminer la composition en lignées évolutives, sous-lignées et sous-espèces d'abeilles dans ces trois archipels à l'aide d'un large échantillonnage (n = 1184 colonies) mené dans les Mascareignes (La Réunion, Mauritius, Rodrigues), aux Seychelles (Mahé, Praslin, La Digue) et aux Comores (Grande Comore, Anjouan, Mohéli, Mayotte). Suite à cela la diversité génétique des populations de Madagascar et de plusieurs pays continentaux d'Afrique et d'Europe a été comparée à celle des archipels du SOOI. Les régions mitochondriales

†† **Ce chapitre est en cours de préparation en vue d'une soumission.**

intergénique COI-COII et codante du gène ND2 ont été séquencés dans toutes les populations échantillonnées.

Trois des quatre lignées évolutives ont été détectées (A, C et M) et jusqu'à quatre sous-espèces différentes ont été identifiées dans les archipels du SOOI. D'importantes différences en terme de composition maternelle ont été observées entre les différentes îles et ce plus particulièrement dans les Mascareignes pour lesquels les lignées C et M ont été détectées. La sous-espèce *A. m. unicolor* domine les populations de 10 des 11 îles étudiées. La diversité des séquences a montré une différenciation au sein de la sous-lignée africaine A_I, avec un complexe de séquences privées à la zone SOOI bien différent du complexe continental regroupant des populations de sous-espèces divergentes. Presque toutes les îles possédaient une séquence privée de la région COI-COII dérivant de la séquence majoritaire précédemment détectée à Madagascar. D'autre part, un patron général de divergence génétique résultant d'anciennes colonisations a été détecté dans les trois archipels.

Cette étude a permis de décrire 50 nouvelles séquences de la région intergénique COI-COII dont 13 seulement retrouvées dans la région SOOI ; de même 24 nouvelles séquences ND2 ont été décrites dont 6 d'entre elles uniquement présentes dans les îles du SOOI. L'ensemble des résultats des marqueurs COI-COII et ND2 ont montré que l'archipel des Comores serait une zone de contact entre les populations insulaires et continentales de lignée évolutive africaine. Etant donné sa localisation géographique très proche des côtes Est africaines et de la composition génétique maternelle détectée, il semblerait que les îles des Comores aient formé un passage de type *stepping-stone* (proche en proche) pour les abeilles du continent africain vers la région SOOI.

Mots clés : région intergénique COI-COII, ND2, *A. m. unicolor*, séquençage, îles, tropical, Sud-Ouest de l'océan Indien, lignées maternelles

Evolutionary lineages and subspecies diversity of honeybee populations from the South West Indian Ocean islands

Maéva Angélique Techer[1,2], Johanna Clémencet[1], Christophe Simiand[2], Bernard Reynaud[2], Delatte Hélène[2]

[1] Université de La Réunion, UMR PVBMT, F-97715 Saint Denis cedex 9, La Réunion, France

[2] CIRAD, UMR PVBMT, 7 chemin de l'Irat, Ligne Paradis, 97410 Saint Pierre, La Réunion, France

Abstract

The South West Indian Ocean archipelagos and Madagascar constitute a hotspot of biodiversity with high rate of endemism. In these insular systems, the honeybee *A. mellifera* has a key role as a generalist pollinator but remained poorly studied; yet, many islands such as the Mascarene, Seychelles and Comoros archipelagos host honeybee populations. In the area, the endemic subspecies *A. m. unicolor* has been described in Madagascar and belongs to the African lineage. Furthermore, introduction of European subspecies for beekeeping has been documented in the past in several islands. Nevertheless, no records were available on the adaptation of those imported honeybees in their new tropical insular environment.

So that, the evolutionary lineages, sub-lineages and honeybee subspecies composition in these archipelagos were investigated with an extensive sampling (n = 1184 colonies) from the Mascarenes (La Réunion, Mauritius, Rodrigues), Seychelles (Mahé, Praslin, La Digue), Comoros (Grande Comore, Anjouan, Mohéli, Mayotte) and compared to the genetic diversity of populations from Madagascar and several countries of Africa and Europe. The sequencing method was applied on the intergenic COI-COII and the coding ND2 regions on all populations.

Three of the four evolutionary lineages were detected (A, C and M) and up to four subspecies sequences were identified in the SWIO archipelagos. Striking

differences of maternal composition was observed among islands and especially for the Mascarene archipelago on which C and M lineages were detected. For 10 of the SWIO islands out of the 11, the subspecies *A. m. unicolor* was dominant. Sequence diversity showed a differentiation among the African sub-lineage A_I with a private group observed in the SWIO area and a continental group was divergent from all others subspecies diversity. Almost each island had private sequence deriving from the main sequence detected in Madagascar. Moreover pattern of genetic divergence resulting from old colonisations phenomenon were observed for all three archipelagos. In this study, 50 COI-COII sequences were newly described and 13 were only found in the SWIO; 24 ND2 sequences were newly described including 6 which were private to the SWIO islands. According to both COI-COII and ND2 results, Comoros archipelago was detected as a contact area between insular and continental African populations. Regarding its geographical location and genetic composition, the Comoros islands could have formed a stepping-stone pathway for African honeybees into the SWIO area.

Keywords: **COI-COII intergenic region, ND2, *A. m. unicolor*, sequencing, islands, tropical, South West Indian ocean, maternal lineages**

1. Background

The honeybee *Apis mellifera* is indigenous of Africa, Europe and Middle East but have been spread worldwide with beekeeping (Crane, 1999). Two decades ago, morphometric approaches separated *A. mellifera* into 24 subspecies which were subdivided into four distinct evolutionary branches: African lineage A, European lineages M and C, and Oriental lineage O (Ruttner, 1988). The branches classification has been confirmed as evolutionary lineages and subspecies division was slightly modified by several molecular approaches (mtDNA, SNP) (Garnery *et al.*, 1992, Arias and Sheppard, 1996, Franck *et al.*, 2000b, Franck *et al.*, 2001, Whitfield *et al.*, 2006, Kandemir *et al.*, 2011, Han *et al.*, 2012, Wallberg *et al.*, 2014). Additionally to the previous described lineages, a Yemenite sub-lineage Y (mtDNA) (Franck *et al.*, 2001) and African sub-lineage Z (mtDNA and microsatellites) (Alburaki *et al.*, 2011, Alburaki *et al.*, 2013) were also recognized.

The mitochondrial COI-COII intergenic region has been extensively used to detect evolutionary lineages in honeybee populations, as they differed in composition of P and Q units (Cornuet and Garnery, 1991, Meixner *et al.*, 2013). One simple method was developed by Garnery *et al.* (1993) using a PCR-RFLP to differentiated tropical A lineage (characterized by P_0 unit and up to four repetitions of Q), Atlantic A lineage (characterized by P_1 unit and up to three repetitions of Q), European M lineage (characterized by P unit and up to four repetitions of Q) and European C lineage (characterized by single Q unit) (Garnery *et al.*, 1998a). However, one limit to this test is that some profiles such as A1 and A4 are commonly distributed in several subspecies populations in Africa (Franck *et al.*, 2001). For that reason, sequencing is used to better assess the maternal lineage diversity. Compared to the partially non-coding COI-COII region, the ND2 region is submitted to gene selection and evolved more slowly, so this marker has been particularly used to differentiate the honeybee at the subspecies level (Arias and Sheppard, 1996).

The exact number of described subspecies differs between studies and varied from 26 to 30. The European M lineage includes *A. m. mellifera* subspecies and the West- Mediterranean *A. m. iberiensis* subspecies (Ruttner, 1988, De la Rúa *et al.*, 2009). Within the C lineage subspecies, the most used subspecies among beekeepers are the

carnolian honeybee *A. m. carnica* and the Italian honeybee *A. m. ligustica* (Franck *et al.*, 2000a). Currently, 11 African subspecies are recognized (Engel, 1999, Meixner *et al.*, 2011): *A. m. intermissa* and *A. m. sahariensis* in North Africa; *A. m. lamarckii*, *A. m. simensis* and *A. m. yemenitica* in North-Eastern Africa, *A. m. adansoni* in the West and Central part of Africa, *A. m. scutellata* and *A. m. capensis* in southern Africa, *A. m. monticola* in the mountains region of south-eastern Africa, *A. m. litorea* in the South-East of Africa, and finally *A. m. unicolor* in Madagascar.

In the South West of the Indian Ocean (SWIO), several archipelagos and the large continental island of Madagascar are located at the East of Africa. The Mascarene archipelago is located 900 km East of Madagascar and consists of three volcanic islands: La Réunion (2 512 km²), Mauritius (1 865 km²) and Rodrigues (108 km²). The Comoros archipelago lies between the North-West of Madagascar and the East coast of Mozambique (Mozambique Channel) and consist of four volcanic islands: Grande Comore (1 148 km²), Anjouan (424 km²), Mohéli (290 km²) and Mayotte (376 km²). On the other hand, Seychelles archipelago is composed of 115 islands (granitic and volcanic) including the three main islands: Mahé (155 km²), Praslin (38 km²) and La Digue (10 km²). The honeybee is present in all three archipelagos but its presence before human colonisation is unknown. The subspecies *A. m. unicolor* was described as endemic to Madagascar and belong to the African lineage (Ruttner, 1988). Yet, this subspecies appeared to be clearly differentiated from the East-coast and South African subspecies using morphometric (Ruttner, 1988, Kandemir *et al.*, 2011) and molecular markers including microsatellites (Rasolofoarivao *et al.*, 2015) and SNPs (Han *et al.*, 2012, Whitfield *et al.*, 2006). Regarding their geographical locations, Madagascar and Africa could be the potential populations of origin of the honeybee in the SWIO archipelagos, as it was already observed in other taxa (Raxworthy *et al.*, 2002, Kuntner and Agnarsson, 2011, Warren *et al.*, 2006). Nonetheless, in the Mascarenes and Seychelles, several importations of European subspecies such as *A. m. carnica*, *A. m. ligustica* and *A. m. mellifera* have been reported (Bappoo and Ramanah, 1989, Crane, 1999, Ayme, 2014, FAO, 1990, Cheke, 2010).

Recent genetic assessment in Madagascar has allowed to detect 16 sequences (A_I sub-lineage), only described in endemic *A. m. unicolor* populations (Rasolofoarivao *et al.*, 2015). One of these sub-specific sequence has also been detected in the Seychelles

archipelago (*n* = 111 colonies) (Techer *et al.*, 2015a). Yet, microsatellites analyses suggested a population divergence between colonies from the Seychelles having same *A. m. unicolor* sequences and those from Madagascar (Techer *et al.*, 2015a). Nonetheless, the SWIO also presented a particular case with Rodrigues in which all sampled colonies belonged to the European C lineage (*n* = 524) (Techer *et al.*, 2015b). Using the PCR-RFLP *DraI*, the tropical African sub-lineage A_I was detected in La Réunion and Mauritius in the late 1990s (20 and 10 colonies, respectively) (Franck *et al.*, 2001) and confirmed recently by a large sampling and the same method (Techer *et al.*, in prep. **Chapitre 4**). Furthermore, evidence of European lineages C and M were found in these two islands but in contrasting proportions. Nuclear analyses showed that even if COI-COII profile patterns were identical, all SWIO archipelagos populations genetically differentiated among them and especially from Madagascar.

The aims of this study was i) to identified potential source populations and subspecies for the SWIO islands, ii) understand the colonization and/or introduction patterns followed by the *A. mellifera* in the SWIO archipelagos, iii) to assessed the mitochondrial diversity and prospect for private sequences and finally iv) to understand the processes behind the honeybee populations diversification in the Mascarenes, Comoros and Seychelles. For that, we studied SWIO honeybee colonies and sequenced the COI-COII intergenic region and the ND2 gene in order to have two evolutionary scales.

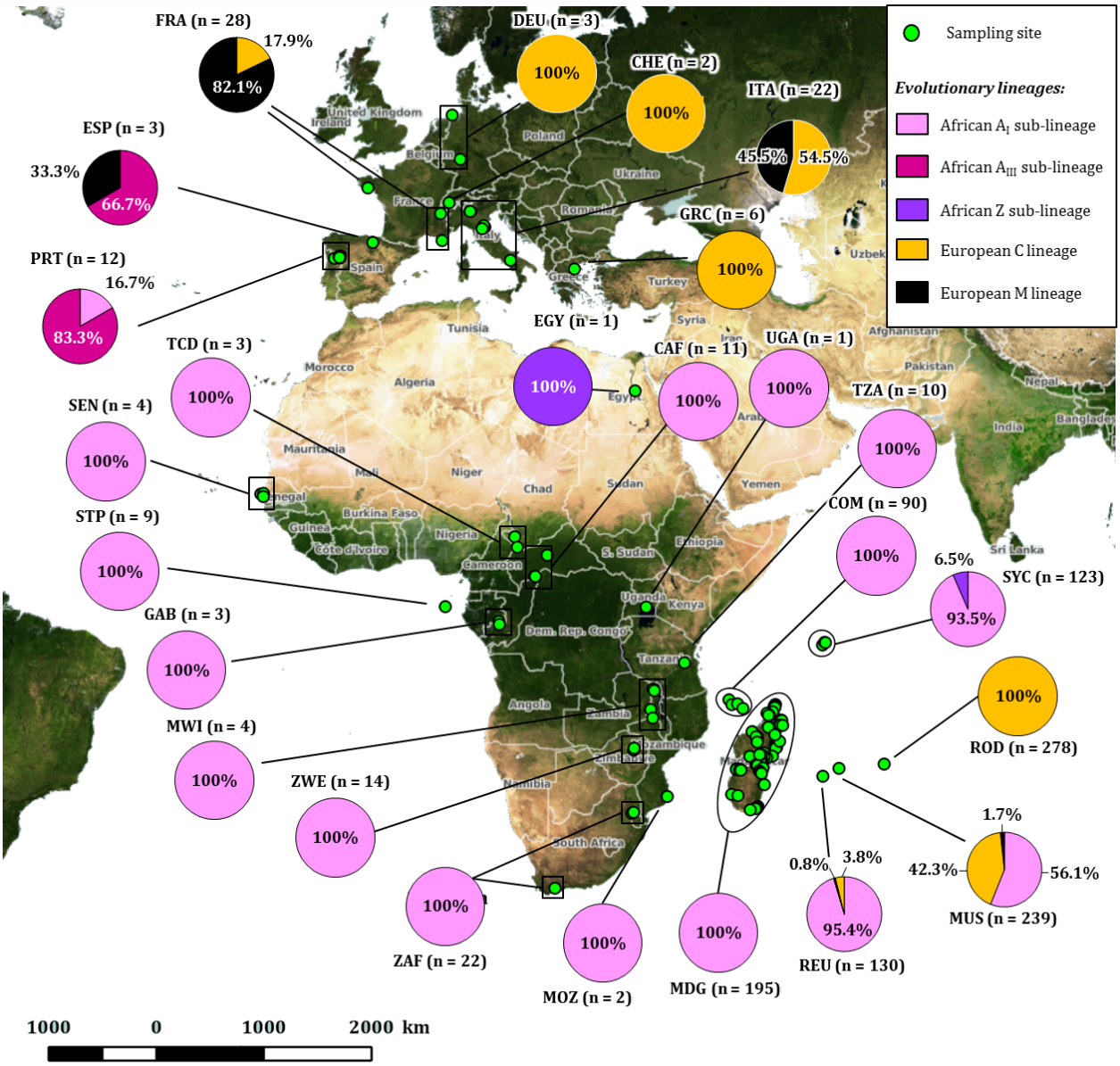


Figure II-1 : Map of the sampling location and distribution of the detected honeybee evolutionary lineages. Populations were sampled in islands of the South West Indian Ocean, Africa and Europe. Evolutionary lineages and sub-lineages (A_I, A_{III}, Z, C and M) were determined by the sequencing of the mtDNA COI-COII intergenic region. Country and island code are indicated near each frequency diagram with the associated number of sequence obtained. OpenStreetLayer was used to construct the map.

2. Materials and Methods

2.1. Sampling in the SWIO islands

A total of 1024 colonies were studied from the SWIO area from Madagascar (sampling from (Rasolofoarivao *et al.*, 2015)); the Mascarene archipelago: La Réunion, Mauritius and Rodrigues (sampling from (Techer *et al.*, 2015b)); the Seychelles archipelago: Mahé, Praslin and La Digue (sampling from (Techer *et al.*, 2015a)) and the Comoros archipelago: Grande Comore, Anjouan, Mohéli and Mayotte (Figure II-1). One worker per colony was collected inside or at the entrance of the colony. Sampling details are given in Table II-1. The sampling sites in La Réunion (n = 83) and Mauritius (n = 24) were representative of the different habitats present on the islands (Figure II-S1 and II-S2). Almost all samples were from managed colonies and came from 82 apiaries belonging to 64 beekeepers in La Réunion (and one wild colony) and from 23 apiaries belonging to 15 beekeepers in Mauritius (and one wild colony). For the Comoros islands, one worker honeybee was collected on flower per distant sites, with a minimum of 5 km.

2.2. Sampling in the African and European populations

In Africa, a total of 84 colonies were sampled from 26 sites distributed in 12 countries: Egypt, Senegal, São Tomé Island, Chad, Central African Republic, Gabon, Uganda, Tanzania, Malawi, Zimbabwe, Mozambique and South Africa (Table II-1 and Figure II-1). Samples from Egypt, São Tomé Island, Malawi, Zimbabwe (1995) were obtained from INRA Avignon (Franck *et al.*, 2001, Franck, 1999). Based on geographical range, African sampling sites encompassed natural range of A. m. adansonii, A. m. lamarckii, A. m. scutellata, A. m. capensis, A. m. monticola and A. m. litorea subspecies.

Table II-1 : Sampling location details for South West Indian Ocean islands, African and European populations by countries. Table details map code (corresponding to Fig. 1), number of sampling sites and beekeepers, date of the sampling, $N_{COI-COII}$: the number of honeybee colonies sampled and sequence at the COI-COII intergenic region and N_{ND2}: the number of individuals sequenced at the ND2 gene. Reference source of some samples integrated in this survey are also specified.

	Abbreviation	N_{site}	$N_{beekeepers}$	Sampling date	$N_{COI-COII}$	N_{ND2}	
South West Indian Ocean islands							
La Réunion	REU	83	67	Nov. 2011- Nov.2012	**130**	**16**	
Mauritius	MUS	24	15	2012	**239**	**14**	
Rodrigues	ROD	20	16	2013	**278**	**6**	a
Madagascar	MDG	49		2011-2013	**142**	**23**	b
		1	1	2014	**5**	**1**	
		4		1996-1998	**17**		c
Mahé	MAH	17	10	2013	**50**	**5**	d
Praslin	PRA	13	3	2013	**45**	**4**	d
		2	3	2015	**2**		
La Digue	DIG	2	2	2013	**26**	**4**	d
Grande Comore	GCO	10		2014	**29**	**8**	
Anjouan	ANJ	11		2014	**27**	**5**	
Mohéli	MOH	3		2014	**10**	**2**	
Mayotte	MYT	18		2013	**24**	**4**	
African populations							
Egypt	EGY	1		1997	**1**	**1**	c
Senegal	SEN	3	3	2015	**4**	**4**	
São Tomé Island	STP	1		1998	**9**	**4**	c
Chad	TCD	2	2	2015	**3**	**1**	
Central African Republic	CAF	5	5	2013	**11**	**5**	
Gabon	GAB	2	2	2014	**3**	**3**	
Uganda	UGA	1	1	2015	**1**	**1**	
Tanzania	TZA	1	1	2015	**10**	**4**	
Malawi	MWI	4		1995	**4**	**3**	c
Zimbabwe	ZWE	1		1995	**5**	**3**	c
		1	1	2014	**9**	**6**	
Mozambique	MOZ	1	1	2015	**2**	**2**	
South Africa	ZAF	1	1	2013	**17**	**6**	
		2		2015	**5**	**3**	
European populations							
Portugal	PRT	6	1	2013	**12**	**4**	
Spain	ESP	1		2013	**3**	**1**	
France	FRA	3	3	2013	**28**	**13**	
Switzerland	CHE	1	1	2013	**2**	**1**	
Germany	DEU	1		1998	**2**	**2**	c
		1	1	2013	**1**	**1**	
Italy	ITA	8	8	1997	**22**	**8**	c
Greece	GRC	1	1	2015	**6**	**2**	
					1184	**170**	

In Europe, 76 colonies were sampled from 22 sites distributed in seven countries: Spain, Portugal, France, Switzerland, Germany, Italy and Greece (Table II-1 and Figure II-1). Samples from Germany (1998) and Italy were acquired from INRA Avignon (Franck *et al.*, 2001, Franck, 1999). Based on geographical range, European sampling sites covered natural range of *A. m. mellifera*, *A. m. iberiensis*, *A. m. carnica*, *A. m. ligustica* and *A. m. cecropia* subspecies.

2.3. DNA extraction

One worker per colony was used to analyse both mitochondrial markers. Total DNA was extracted from the six legs for SWIO honeybees and one leg for collection samples. Legs were incubated in 400µL of extract buffer containing 0.1 M Tris HCl (pH 8.0), 80 mM EDTA, 100 mM NaCl, 200 mM sucrose, 2% SDS, 0.1 mg/ml proteinase K and H_2O, overnight at 37° C. Then extracts were centrifuged for 20 sec at 12 000 rpm then 50µl potassium acetate 8M was added, followed by a centrifugation for 20 min at 12 000 rpm. DNA was ethanol precipitated at ambient temperature, pelleted (30 min at 12 000 rpm), rinsed in 95% ethanol, vacuum dried, and resuspended in 100 µL of Tris HCl 10mM and EDTA 1mM. DNA was then assayed by spectrophotometry (Nanodrop V8000) and diluted to 5 ng per µl for following analyses.

2.4. Amplification and sequencing of the COI-COII intergenic region and ND2 region

Analysis on the intergenic COI-COII region was carried out using E2 (5'-GGCAGAATAAGTGCATTG -3') and H2 (5'- CAATATCATTGATGACC -3') primers (Garnery *et al.*, 1993). All samples (n = 1184) were analysed for the COI-COII marker. PCR reactions were performed in 30 µL of final volume containing 15µl of Type-it© (*Qiagen*), 20 pmol of each primer, H_20 and 2 µL of DNA. Reactions were submitted to a first denaturation step of 5 min at 94°C, followed by 35 cycles of denaturation step for 1 min at 92 °C, hybridization step for 45s at 48 °C, elongation step for 2 min at 62 °C, and a final elongation during 7 min at 62°C.

Table II-2 : COI-COII intergenic region sequence name, composition, and length with associated accession number (GenBank) information. Sequence with * were newly described and their name was based on the *DraI* nomenclature identification from Garnery *et al.* (1993) and Rortais *et al.* (2011).

ST COI-COII	Type	Length (bp)	Accession number
A1_a	P_0Q	563	KT828416
A1_b	P_0Q	563	KT828417
A1_MAD3	P_0Q	563	KT828418
A1_MAD4	P_0Q	564	KT828419
A1_MAD5	P_0Q	562	KT828420
A1_MAD6	P_0Q	558	KT828421
A1_MAD7	P_0Q	563	KT828422
A1_MAD8	P_0Q	565	KT828423
A1_MAD9	P_0Q	562	KT828424
A1_MAD10	P_0Q	563	KT828425
A1_MAD11	P_0Q	559	KT828426
A1_MAD12	P_0Q	564	KT828427
A1_MAD13	P_0Q	564	KT828428
A1_MAD14	P_0Q	563	KT828429
A1_MAD15	P_0Q	563	KT828430
A1_MAD16	P_0Q	564	KT828431
A1_REU1*	P_0Q	565	KT828432
A1_SEY1	P_0Q	563	KT828433
A1_SEY2	P_0Q	563	KT828434
A1_GCO1*	P_0Q	563	KT828435
A1_GCO2*	P_0Q	562	KT828436
A1_ANJ1*	P_0Q	565	KT828437
A1_MYT1*	P_0Q	563	KT828438
A1_MYT2*	P_0Q	565	KT828439
A1_MYT3*	P_0Q	563	KT828440
A1_CAF1*	P_0Q	563	KT828441
A1_CAF2*	P_0Q	556	KT828442
A1_GAB1*	P_0Q	563	KT828443
A1_TZA1*	P_0Q	564	KT828444
A1_MOZ1*	P_0Q	567	KT828445
A49_MUS1*	P_0Q	564	KT828446
Z7_EGY1	P_0Q	567	KT828447
A4_a	P_0QQ	754	KT828448
A4_b	P_0QQ	755	KT828449
A4_c*	P_0QQ	755	KT828450
A4_MAD1	P_0QQ	756	KT828451
A4_MAD2	P_0QQ	755	KT828452
A4_REU1*	P_0QQ	753	KT828453
A4_MUS1*	P_0QQ	754	KT828454
A4_SEN1*	P_0QQ	755	KT828455
A4_SEN2*	P_0QQ	757	KT828456
A4_STP1*	P_0QQ	757	KT828457

ST COI-COII	Type	Length (bp)	Accession number
A4_CAF1*	P_0QQ	755	KT828458
A4_CAF2*	P_0QQ	755	KT828459
A4_GAB1*	P_0QQ	753	KT828460
A4_TCD1*	P_0QQ	755	KT828461
A4_ZIM1*	P_0QQ	761	KT828462
A4_ZIM2*	P_0QQ	754	KT828463
A4_ZIM3*	P_0QQ	751	KT828464
A4_ZAF1*	P_0QQ	754	KT828465
A4_ZAF2*	P_0QQ	755	KT828466
A4_ZAF3*	P_0QQ	755	KT828467
A4_ZAF4*	P_0QQ	755	KT828468
A4_ZAF5*	P_0QQ	755	KT828469
A4_ZAF6*	P_0QQ	763	KT828470
A4_ZAF7*	P_0QQ	756	KT828471
A4_ZAF8*	P_0QQ	751	KT828472
A4_ZAF9*	P_0QQ	758	KT828473
A6_TCD1*	P_0QQ	755	KT828474
A50_STP1*	P_0QQ	754	KT828475
A50_ZAF1*	P_0QQ	756	KT828476
A51_UGA1*	P_0QQ	754	KT828477
Z2_SEY1	P_0QQ	762	KT828478
A11_PRT1*	P_1QQ	740	KT828479
A11_PRT2*	P_1QQ	739	KT828480
A14_PRT1*	P_1QQ	738	KT828481
A16_PRT1*	P_1QQQ	934	KT828482
A16_PRT2*	P_1QQQ	932	KT828483
M3_a	PQ	554	KT828484
M6_FRA1*	PQ	554	KT828485
M6_FRA2*	PQ	552	KT828486
M4_a	PQQ	750	KT828487
M4_b	PQQ	751	KT828488
M65_FRA1*	PQQ	750	KT828489
M7_a	PQQ	750	KT828490
M7_MUS1*	PQQ	751	KT828491
M7'_a*	PQQQ	946	KT828492
C1_a	Q	497	KT828493
C1_ROD1	Q	497	KT828494
C2_a	Q	496	KT828495
C2_b	Q	496	KT828496
C2_c	Q	495	KT828497
C2_d	Q	496	KT828498
C2_DEU1*	Q	495	KT828499

At least one individual per island or country and for each COI-COII sequence type (ST) detected was investigated at the ND2 region. Partial ND2 gene was amplified using ILE (5'-TGATAAAAGAAATATTTTGA-3') and L1 primers (5'-GAATCT AATTAATAAAAAA-3') (Arias and Sheppard, 1996). The same PCR reaction as COI-COII one was used for ND2 amplification. Reactions were submitted to a first denaturation step of 5 min at 94°C, followed by 35 cycles of denaturation step for 30 sec at 92 °C, hybridization step for 1 min 30 sec at 47 °C, elongation step for 2 min at 63 °C, and a final elongation during 10 min at 63°C. All PCR products were sent for sequencing to Macrogen©.

2.5. Genetic diversity and phylogenetic analyses

Sequences were manually checked and aligned using Mega 5.1 (Tamura *et al.*, 2011). Newly described sequences types (named thereafter ST) were submitted to GenBank NCBI database (Table II-2 and II-3). For COI-COII ST names, previously described nomenclature based on *DraI* restriction profiles has been used (Garnery *et al.*, 1993, Rortais *et al.*, 2011). This nomenclature is based on the structure of the sequence and localisation of *DraI* restriction site. Study of the structure of COI-COII intergenic region consisted in the description of the sequence size and composition depending on the form of P (P_0, P_1 and P) unit and number of repeats of Q unit. The P_0 element differs from P by a deletion of 13 bp and from P_1 by a deletion of 15 bp (Franck *et al.*, 2001). The P unit is always associated with at least one Q unit but this last one can occur alone.

Subsequently to evolutionary lineage identification, maternal sub-lineage and PCR-RFLP *DraI* profile were described for each individual by comparing with previous studies and blastn on GenBank. Similarity among the COI-COII ST was investigated using the goeBURST Minimal Spanning Tree from PHYLOVIZ software (Francisco *et al.*, 2012). In addition, frequencies of the COI-COII ST per island and African and European outgroups was visualized on graphical output.

Table II-3 : ND2 region sequence name (size = 623bp) and length with associated accession number (GenBank) information. Sequence with * were newly described.

Sequence type ND2	Accession number
SWIO01*	KT828500
SWIO02*	KT828501
SWIO03*	KT828502
SWIO04*	KT828503
SWIO05*	KT828504
SWIO06*	KT828505
AFR01	KT828506
AFR02*	KT828507
AFR03*	KT828508
AFR04*	KT828509
AFR05	KT828510
AFR06	KT828511
AFR07	KT828512
AFR08*	KT828513
AFR09	KT828514
AFR10*	KT828515
AFR11	KT828516
AFR12*	KT828517
AFR13	KT828518
EUR01*	KT828519
EUR02*	KT828520
EUR03	KT828521
EUR04*	KT828522
EUR05*	KT828523
EUR06*	KT828524
EUR07*	KT828525
EUR08*	KT828526
EUR09	KT828527
EUR10*	KT828528
EUR11*	KT828529
EUR12*	KT828530
EUR13*	KT828531
EUR14	KT828532
EUR15	KT828533
EUR16*	KT828534

For ND2 sequence comparison, an Approximately-Maximum-Likelihood tree was computed using FastTree (Price *et al.*, 2009) using the Generalised Time Reversible (GTR) + CAT model and 1000 bootstrap replications. The phylogenetic tree was based on all ND2 ST for each island or country and with at least one representant of each COI-COII ST. In addition, 49 sequences from other populations and subspecies in GenBank database were incorporated in the analysis (Arias and Sheppard, 1996, Kandemir *et al.*, 2006, Ilyasov *et al.*, 2011).

3. Results

3.1. Evolutionary lineages identification and distribution islands

DNA amplification and sequencing of the COI-COII intergenic region was successful for all analyzed individuals (n = 1184). In the SWIO region, as previously described (Rasolofoarivao *et al.*, 2015), colonies from Madagascar were all from African A lineage with 162 (98.8%) having P_0Q structure and two with P_0QQ (Figure II-1, Table II-4). Colonies from the four Comoros islands were also exclusively from tropical African lineage and exhibited only the P_0Q COI-COII sequence structure (Figure II-1, Table II-4). In the Seychelles archipelago, colonies (2013 and 2015) exclusively presented African lineage structure with Mahé (100% P_0Q), Praslin (91.5% P_0Q and 8.5% P_0QQ) and La Digue (84.6% P_0Q and 15.4% P_0QQ) (Techer *et al.*, 2015a). La Réunion and Mauritius exhibited different sequence structure indicating presence of three evolutionary lineages A, C and M but in different proportions (Figure II-1, Table II-4). La Réunion was characterized by 94.6% of the colonies from African A lineage (118 P_0Q and 5 P_0QQ), 4.6% from European C lineage (Q) and 0.8% from European M lineage (1 PQQ). In the Mauritius sampling, African and European lineages were equally detected with 56.1% of the colonies belonging to the A lineage (132 P_0Q and 2 P_0QQ), 42.3% to the C lineage (Q) and only 1.7% to the M lineage (4 PQQ) (Figure II-1, Table II-4).

Table II-4 : Distribution and occurrence of the 84 described COI-COII intergenic region sequences for each sampled population**.** Population details are given per islands in the South West Indian Ocean, and per country in Africa and Europe. Sequences are ordered by evolutionary lineages A (and Z sub-lineage): P_0Q, P_0QQ, P_1QQ and P_1QQQ (alternate pink); M lineage: PQ, PQQ (alternate gray) and PQQQ and C lineage: Q (alternate blue).

		La Réunion	Maurice	Rodrigues	Mahé	Praslin	La Digue	Grande Comore	Anjouan	Mohéli	Mayotte	Madagascar	Egypt	Senegal	Chad	CAF	São Tomé	Gabon	Uganda	Tanzania	Malawi	Zimbabwe	Mozambique	South Africa	Portugal	Spain	France	Germany	Switzerland	Italy	Greece
P_0Q	A1_a		1													1				7	2		1	2								
	A1_b															1				1					2							
	A1_Mad3	116	130		46	43	22	15	21	10	19	143		2							2										
	A1_Mad4											1																				
	A1_Mad5											2																				
	A1_Mad6											1																				
	A1_Mad7											1																				
	A1_Mad8											1																				
	A1_Mad9											2																				
	A1_Mad10											3																				
	A1_Mad11											1																				
	A1_Mad12										1	1																				
	A1_Mad13											2																				
	A1_Mad14											1																				
	A1_Mad15	1						7	1			2																				
	A1_Mad16											1																				
	A1_REU1	1																														
	A1_Sey1				3																											
	A1_Sey2				1																											
	A1_GCO1							3																								
	A1_GCO2							4																								
	A1_ANJ1								5																							
	A1_MYT1										2																					
	A1_MYT2										1																					
	A1_MYT3										1																					
	A1_CAF1															3																
	A1_CAF2															1																
	A1_GAB1																	2														
	A1_TZA1																			1												
	A1_MOZ1																						1									
	A49_MUS1		1																													
	Z7_EGY1												1																			
	TOTAL	**119**	**132**		**50**	**43**	**22**	**29**	**27**	**10**	**24**	**162**	**1**	**2**		**6**		**2**		**9**	**4**		**2**	**2**	**2**							

Table II-4 : (following, part 2/3)

		La Réunion	Maurice	Rodrigues	Mahé	Praslin	La Digue	Grande Comore	Anjouan	Mohéli	Mayotte	Madagascar	Egypt	Senegal	Chad	CAF	São Tomé	Gabon	Uganda	Tanzania	Malawi	Zimbabwe	Mozambique	South Africa	Portugal	Spain	France	Germany	Switzerland	Italy	Greece
P_0QQ	A4_a	3														1	7			1												
	A4_b																					5		8								
	A4_c														1	1						4										
	A4_Mad1		1									1																				
	A4_Mad2											1																				
	A4_REU1	2																														
	A4_MUS1		1																													
	A4_SEN1													1																		
	A4_SEN2													1																		
	A4_STP1																1															
	A4_CAF1															2																
	A4_CAF2															1																
	A4_GAB1																	1														
	A4_TCD1														1																	
	A4_ZIM1																					1										
	A4_ZIM2																					3										
	A4_ZIM3																					1										
	A4_ZAF1																							3								
	A4_ZAF2																							1								
	A4_ZAF3																							1								
	A4_ZAF4																							1								
	A4_ZAF5																							1								
	A4_ZAF6																							1								
	A4_ZAF7																							1								
	A4_ZAF8																							1								
	A4_ZAF9																							1								
	A6_TCD1														1																	
	A50_STP1																1															
	A50_ZAF1																							1								
	A51_UGA1																		1													
	Z2_Sey1					4	4																									
	TOTAL	**5**	**2**			**4**	**4**					**2**		**2**	**3**	**5**	**9**	**1**	**1**	**1**		**14**		**20**								

Table II-4 : (following, part 3/3)

		La Réunion	Maurice	Rodrigues	Mahé	Praslin	La Digue	Grande Comore	Anjouan	Mohéli	Mayotte	Madagascar	Egypt	Senegal	Chad	CAF	São Tomé	Gabon	Uganda	Tanzania	Malawi	Zimbabwe	Mozambique	South Africa	Portugal	Spain	France	Germany	Switzerland	Italy	Greece
P_1QQ	A11_PRT1																								5	2						
	A11_PRT2																								1							
	A14_PRT1																								1							
P_1QQ	A16_PRT1																								1							
	A16_PRT2																								2							
	TOTAL																								**10**	**2**						
PQ	M3_a																														2	
	M6_FRA1																										2					
	M6_FRA2																										1					
PQQ	M4_a	1																									11					
	M4_b																										2					
	M65_FRA1																										3					
	M7_a																														7	
	M7_MUS1		4																													
PQQQ	M7'_a																									1	4				1	
	TOTAL	**1**	**4**																							**1**	**23**				**10**	
Q	C1_a		20	226																							4		2		12	
	C1_Rod1			2																												
	C2_a	1	81	50																												
	C2_b	1																									1	1				
	C2_c	2																										1				
	C2_d	2																														6
	C2_DEU1																											1				
	TOTAL	**6**	**101**	**278**																							**5**	**3**	**2**		**12**	**6**

All sampled colonies from Africa exhibited the sequence structures characteristic of the tropical A lineage (28 P_0Q and 56 P_0QQ) (Table 3). In European populations, the pattern was more complex. Portugal and Spain colonies were the only ones to present Atlantic African COI-COII structure (P_1QQ and P_1QQQ). Spain, France and Italy presented M lineage PQ, PQQ and PQQQ structures. C lineage was detected in France, Germany, Switzerland, Italy and Greece colonies.

3.2. COI-COII maternal lineages and sequence diversity

Out of the 1184 individuals analyzed, a total of 84 sequences types (ST) were characterized in this survey including 50 newly described sequences (Table II-2, II-4 and Figure II-2). The three evolutionary lineages (A, C and M) were subdivided into five mtDNA maternal sub-lineages (A_I, A_{III}, Z, C and M). A total of 16 *DraI* profile already described have been detected and were grouped as following: 59.7% (n = 707) of A_I sub-lineage (A1, A48 (previously named A1_Mad13), A4, A6), 1.0% (n = 12) of A_{III} sub-lineage (A11, A14, A16), 0.8% (n = 9) of Z sub-lineage (Z2 and Z7), 34.9% (n = 413) of M lineage (M3, M4, M6, M7, M7') and 34.9% (n = 413) C lineage (C1 and C2) (according to the *DraI* nomenclature). Regarding sequence identity the three newly described African *DraI* profile A49, A50 and A51 were also part of A_I sub-lineage (highly similar to A1 and A4 sequences) (Figure II-2). The newly described European sequence M65 was part of M lineage within the PQQ group and shared high similarity with M4. In the haplotype network these five sub-lineages were split into 11 sequences groups (separated by gray dashed lines) regarding COI-COII structure and geographical distribution (Figure II-2). Distribution and number of sequences for each population (island or country) is detailed in Table II-4.

3.3. African maternal lineages: A_I, A_{III} and Z sub-lineages

In all the SWIO islands, the mitochondrial sequence COI-COII A1_Mad3, first described in *A. m. unicolor* populations from Madagascar (Rasolofoarivao *et al.*, 2015), was dominant (75.7%, n = 746) on all islands except on the island of Rodrigues (Figure II-2 and Table II-4).

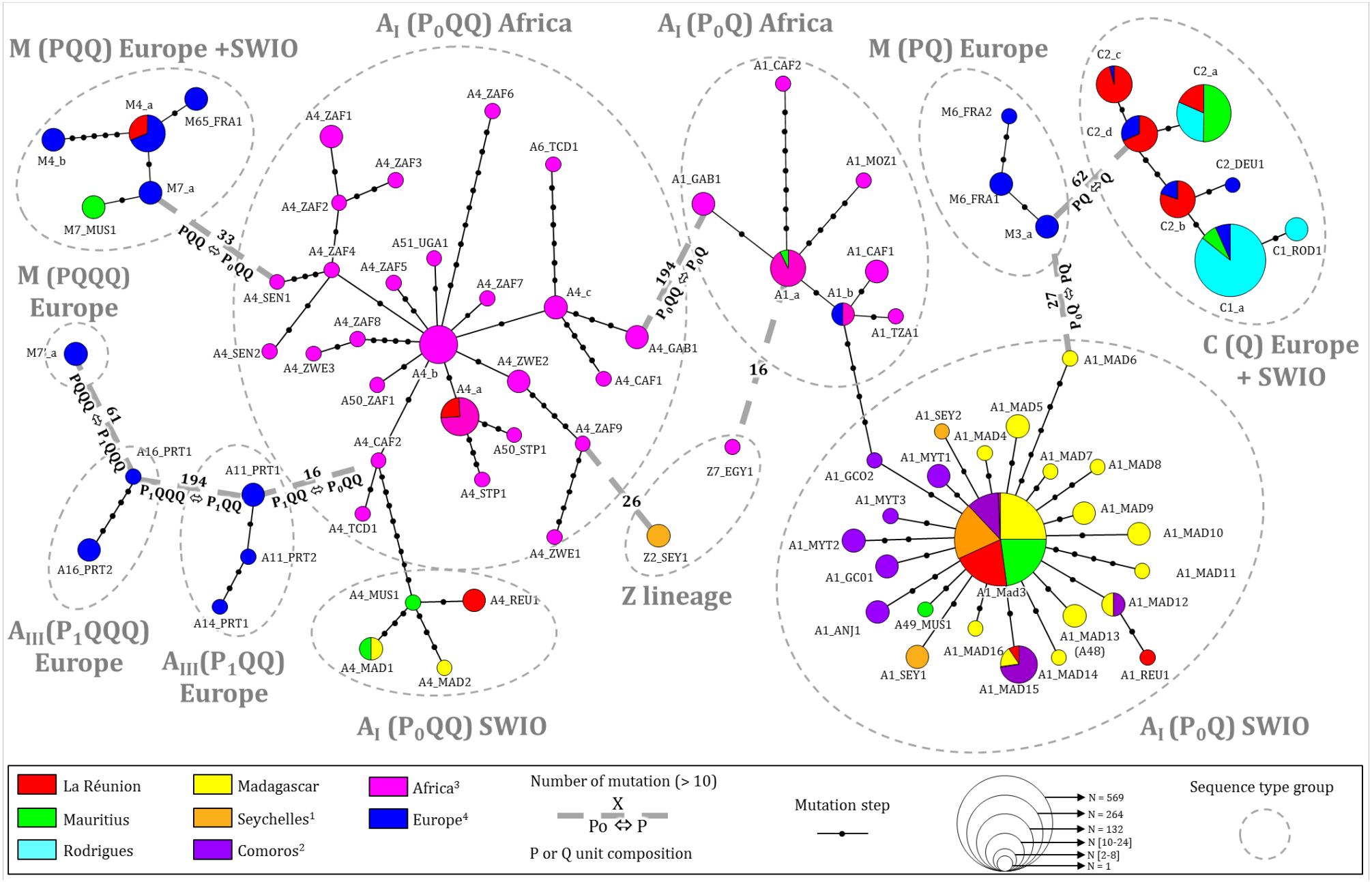

M (PQQ) Europe +SWIO
A_I (P_0QQ) Africa
A_I (P_0Q) Africa
M (PQ) Europe
M (PQQQ) Europe
C (Q) Europe + SWIO
A_III(P_1QQQ) Europe
A_III(P_1QQ) Europe
A_I (P_0QQ) SWIO
Z lineage
A_I (P_0Q) SWIO
M4_a
M65_FRA1
M4_b
M7_a
M7_MUS1
PQQ ⇔ P_0QQ
33
A4_ZAF1
A4_ZAF6
A4_ZAF3
A4_ZAF2
A4_ZAF4
A51_UGA1
A4_ZAF5
A4_ZAF7
A4_SEN1
A4_ZAF8
A4_SEN2
A4_ZWE3
A4_b
A4_a
A4_ZWE2
A50_ZAF1
A4_CAF2
A50_STP1
A4_STP1
A4_TCD1
A6_TCD1
A4_c
A4_GAB1
A4_CAF1
A4_ZAF9
A4_ZWE1
A4_MUS1
A4_REU1
A4_MAD1
A4_MAD2
194
P_0QQ ⇔ P_0Q
A1_CAF2
A1_GAB1
A1_MOZ1
A1_a
A1_CAF1
A1_b
A1_TZA1
16
Z7_EGY1
26
Z2_SEY1
M6_FRA2
M6_FRA1
M3_a
62
PQ ⇔ Q
C2_c
C2_a
C2_d
C2_DEU1
C2_b
C1_ROD1
C1_a
27
P_0Q ⇔ P_0Q
A1_MAD6
A1_SEY2
A1_MAD5
A1_MAD4
A1_MYT1
A1_MAD7
A1_MAD8
A1_GCO2
A1_MYT3
A1_MAD9
A1_MAD10
A1_MYT2
A1_GC01
A1_MAD11
A1_Mad3
A1_MAD12
A1_ANJ1
A49_MUS1
A1_MAD13 (A48)
A1_MAD16
A1_SEY1
A1_MAD14
A1_REU1
A1_MAD15
M7'_a
PQQQ ⇔ P_1QQQ
61
A16_PRT1
194
P_1QQQ ⇔ P_1QQ
A11_PRT1
16
P_1QQ ⇔ P_0QQ
A16_PRT2
A11_PRT2
A14_PRT1
La Réunion
Mauritius
Rodrigues
Madagascar
Seychelles¹
Comoros²
Africa³
Europe⁴
Number of mutation (> 10)
X
Po ⇔ P
P or Q unit composition
Mutation step
N = 569
N = 264
N = 132
N [10-24]
N [2-8]
N = 1
Sequence type group

Figure II-2 : Minimal Spanning Tree based on 84 sequence types of the honeybee COI-COII intergenic region. Haplotype network was based on 1184 honeybees from South West Indian Ocean (SWIO) islands, African and European populations. Each circle represents an individual sequence type (ST), its size indicates frequencies and each color indicates population origin. Mutation steps (including substitution and insertion/deletion) between ST are showed by black dots. Large mutations steps such as the duplication of Q unit and/or deletions between P units (P0, P1 and P) are indicated by gray dashed lines with numbers of mutation.

Seychelles[1]:	Mahé, Praslin and La Digue.
Comoros[2]:	Grande Comore, Anjouan, Mohéli and Mayotte.
Africa[3]:	Egypt, Senegal, Chad, Central African Republic, São Tomé, Gabon, Uganda, Tanzania, Malawi, Zimbabwe, Mozambique and South Africa.
Europe[4]:	Portugal, Spain, France, Germany, Switzerland, Italy and Greece.

In La Réunion, A1_Mad3 sequence was present in 89.2% of the colonies and spread all over the island in 80 sites out of the 83 sampled (Figure II-S1). The same observation was done on Mauritius, in which A1_Mad3 was present on 21 sites out of the 24 even if observed the frequency was lower (54.4%) (Figure II-S2). In the Comoros archipelago, A1_Mad3 was also predominant, with a rate of 100% in Mohéli, 79.2% in Mayotte, 77.8% in Anjouan and 51.7% in Grande Comore (Table II-4). This sequence was also observed in two geographically distant sites of Africa (Senegal and Malawi).

Haplotype network showed that 21 sequences sharing the same *DraI* profile (A1), A48 (A1_Mad13) and A49_MUS1 were highly similar (99 %, up to five mutations of differences) to A1_Mad3 which formed the node. This A1/A48/A49 complex was almost exclusively observed in SWIO islands including sequences occurring only in Madagascar (n = 11), in La Réunion (A1_REU1), in Mauritius (A49_MUS1), in Mahé (A1_Sey1 and A1_Sey2), in Grande Comore (A1_GCO1 and A1_GCO2), in Anjouan (A1_ANJ1) and in Mayotte (A1_MYT1-A1_MYT3) (Figure II-2 and Table II-4). The SWIO A1/A48/A49 STs group was different from the A1 (n = 7) group found in African populations (Figure II-2). A1_a sequence was observed in one site of Mauritius (Figure II-2, II-S2) and also in six sites from five African countries encompassing *A. m. adansonii*, *A. m. litorea*, *A. m. scutellata* and *A. m. capensis*. Results from blastn revealed that A1_a was already described in Argentine and USA Africanized populations [GenBank: JQ582437, JQ582438, GU326335] (Szalanski and Magnus, 2010) and A1_b in *A. m. iberiensis* from the Iberian Peninsula

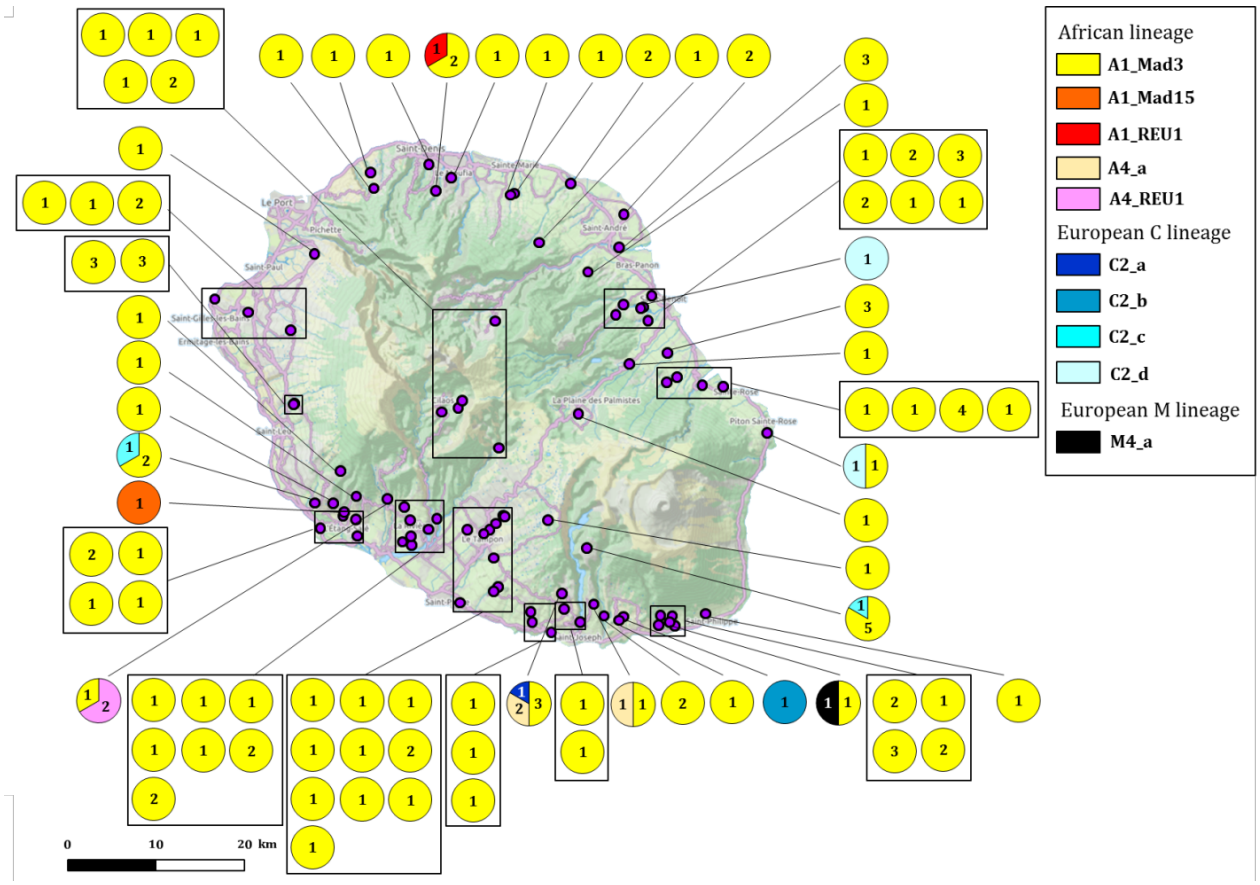


Figure II-S1 : Map of the 83 sampling sites (purple circle) in La Réunion and distribution of the 10 detected sequences of the COI-COII intergenic region. Each diagram represents the frequencies of the sequences type detected and the number of individuals per sequence type is indicated. OpenStreetLayer was used to construct the map.

[GenBank: FJ477985] (Franck *et al.*, 2001) and in Brazil and Uruguay [GenBank: EF033649] (Collet *et al.*, 2006).

The A4 ST group observed in the SWIO (A4_Mad1, A4_Mad2, A4_REU1 and A4_MUS1) differed with at least eight mutations steps (insertion/deletions, substitutions) from all other A4 sequences in Africa. A second complex was observed in the A_I sub-lineage composed of A4, A6, A50 and A51 sequences in which A4_a, b and c were the nodes (Figure II-2). Among all ST groups, A4 sequence group was the most diverse with 26 sequences including 9 only detected in South Africa (Figure II-2). Out of 26 ST, 22 were newly described sequences (Table II-2). A4_a sequence was already found in Argentine [GenBank: JQ582439] while A4_b sequence was detected in Brazil and Uruguay [GenBank: EF033650] (Collet *et al.*, 2006). A4_a was detected in two sites from La Réunion (n = 3 colonies) (Figure II-S1) and also in Central African Republic, São Tomé Island and Tanzania (*A. m. adansonii, A. m. scutellata* and *A. m. litorea* range).

Concerning other African sub lineages, five newly described sequences were only found in the A_{III} sub-lineage from *A. m. iberiensis* natural range (Portugal and Spain). The Z sub-lineage sequences differed from the COI-COII structure of tropical A lineage by 16 mutations for Z7_EGY1 observed in Egypt (natural range of *A. m. lamarckii*) clearly distinct and by 26 mutations for Z2_Sey1 observed in Praslin and La Digue which have been shown highly similar to *A. m. syriaca and yemenitica* sequences (Techer *et al.*, 2015a) (Figure II-2).

3.4. European maternal lineages C and M

Among the M lineage, four sequences groups were detected and were constituted by 9 sequences (n = 34 individuals) including five newly described ones (Figure II-2 and Table II-4). PQ (M3_a, M6_FRA1 and M6_FRA2) and PQQQ (M7'_a) were only detected in European populations (Figure II-2). M3_a was previously described in USA colonies [GenBank: GQ85621] (Magnus and Szalanski, 2010). M4_a was detected in one colony from La Réunion (Figure II-S1) and 11 colonies from France (two sites). This sequence was already detected in protected areas of *A. m. mellifera*

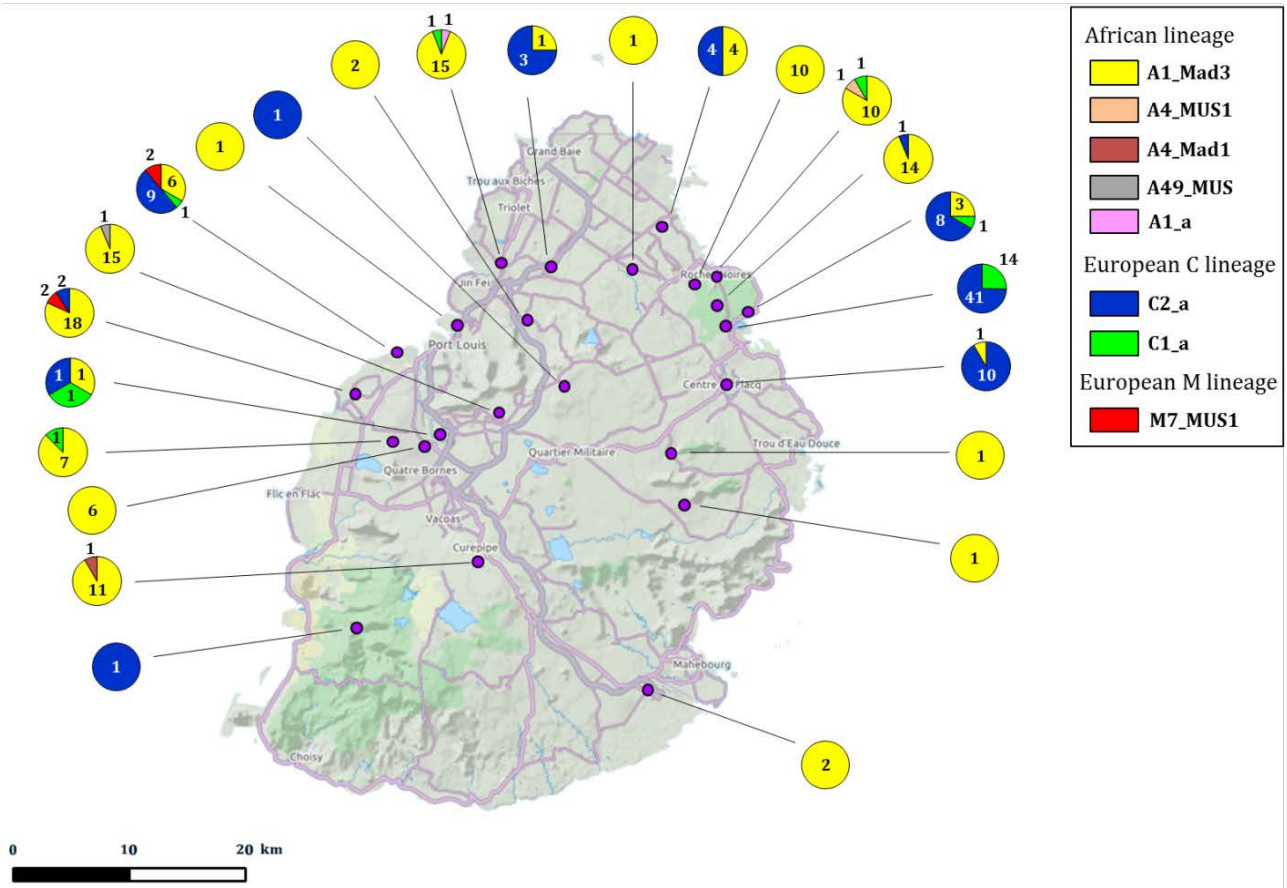


Figure II-S2 : Map of the 24 sampling sites (purple circle) in Mauritius and distribution of the 8 detected sequences of the COI-COII intergenic region. Each diagram represents the frequencies of the sequences type detected and the number of individuals per sequence type is indicated. OpenStreetLayer was used to construct the map.

from Belgium and France [GenBank: KF274625, KF274636] (Pinto *et al.*, 2014). Likewise, the sequence M4_b was already described in native protected areas of *A. m. mellifera* from Belgium, Netherlands and Norway [GenBank: KF274627, KF274628] (Pinto *et al.*, 2014).

In Mauritius, M lineage was detected through the presence of M7_MUS1 sequence in four colonies (two sites, Figure II-S2). M7_MUS1 was 99% identical (one deletion) to M7_a detected in four sites of Italy in which *A. m. ligustica* occurs (n = 7, Fig. 2 and Table 3) and was already observed in USA populations [GenBank: FJ743636 which might have been misnamed as M3 instead of M7] (Szalanski and Magnus, 2010).

Among the C lineage, seven ST were detected, six of them were found in the Mascarene archipelago. C1_a which was previously observed in Rodrigues (Techer *et al.*, 2015b) and was detected in 20 colonies from Mauritius too (seven sites, Figure II-2 and II-S2). C1 *DraI* profile is characteristic of *A. m. ligustica* populations and was found in Italy (Table II-4). In La Réunion, four sequences exhibiting the same C2 *DraI* profile were detected, all being highly similar (99% of identity and between one to three mutations steps) (Figure II-2 and Table II-4). C2_a sequence was present in all islands of the Mascarene archipelago, and was previously observed in Argentine [GenBank: JQ582431], in Canary Islands [GenBank: JF723978, HQ199228.1] in Turkey [GenBank: FJ037776] (Solorzano *et al.*, 2009). On the other hand, C2_b, c and d sequences were solely detected in La Réunion and European populations (Fig. 2 and Table 3). Moreover, C2_b, c, d were identical to ST observed in Turkey [GenBank: FJ037777] (Solorzano *et al.*, 2009) and in *A. m. carnica* colonies from Serbia [GenBank: JQ977702] (Muñoz *et al.*, 2012b) and Romania [GenBank: HQ270149] (Coroian *et al.*, 2014).

3.5. Phylogeny of the ND2 region

A total of 35 sequences of the ND2 region were obtained from the 170 individuals sequenced in this survey. The ND2 sequences were named from SWIO01-06, AFR01-13 and EUR01-16 (Table II-3) and details of their distribution in sampled populations are given in Table II-5. Results from sequence alignment and blast showed that 24 sequences were newly described ones.

Table II-5 : Distribution and occurrence of the 33 haplotypes of the partial ND2 gene for each SWIO island. Only one representant of each combination of ND2 haplotype/population/COI-COII sequence type was represented in the approximate-maximum-likelihood tree (Figure II-3). There were 117 combination obtained from 171 individuals sequenced. Number of sequences per combination is indicated between brackets at the right of COI-COII sequence type. *Newly described sequences.

➔

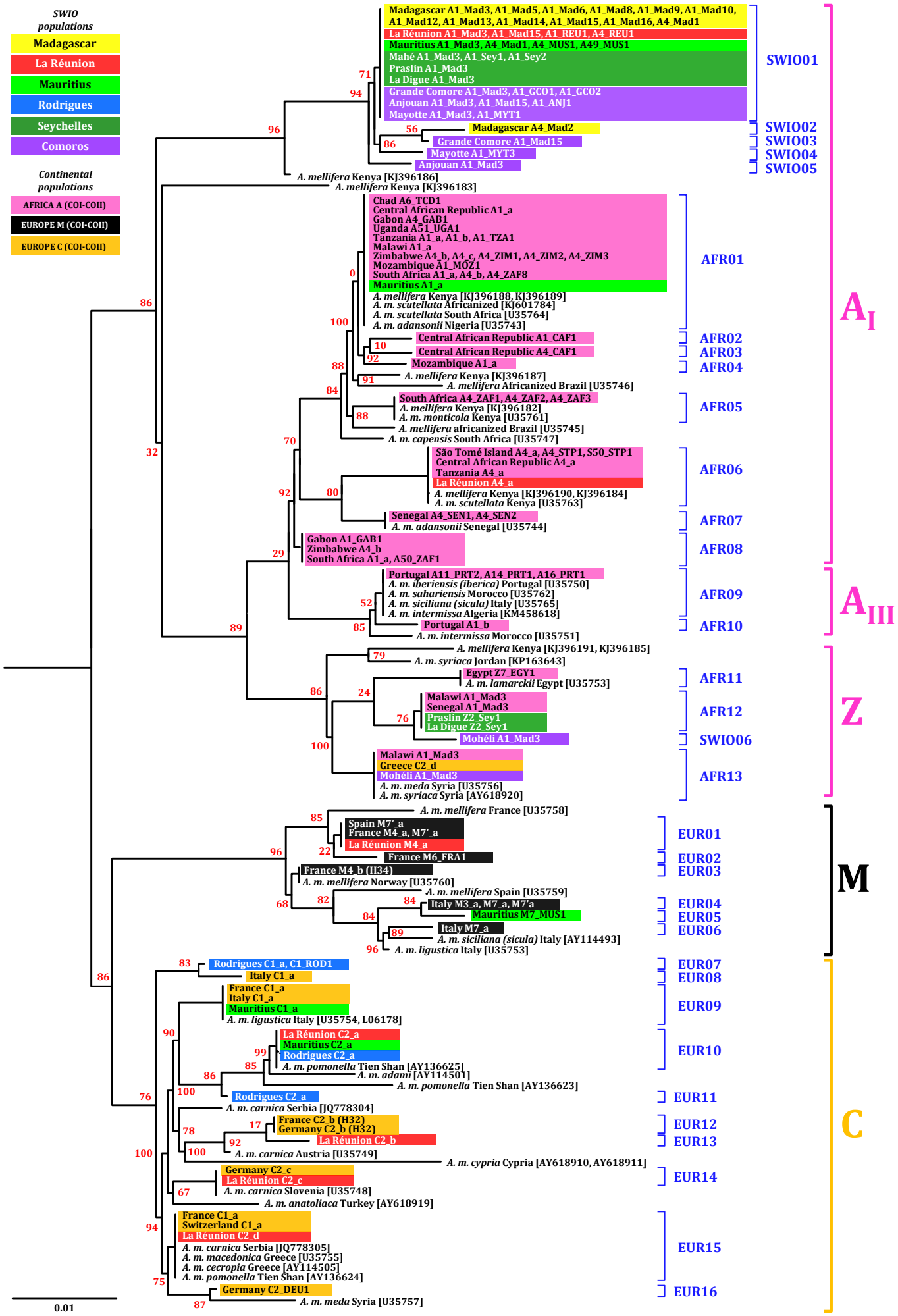
	La Réunion	Maurice	Rodrigues	Mahé	Praslin	La Digue	Grande Comore	Anjouan	Mohéli	Mayotte	Madagascar
SWIO01*	A1_Mad3 (4) A1_Mad15 (1) A1_REU1 (1) A4_REU1 (1)	A1_Mad3 (3) A4_Mad1 (1) A4_MUS1 (1) A49_MUS1 (1)		A1_Mad3 (2) A1_Sey1 (2) A1_Sey2 (1)	A1_Mad3 (2)	A1_Mad3 (2)	A1_Mad3 (2) A1_GCO1 (2) A1_GCO2 (2)	A1_Mad3 (1) A1_Mad15 (1) A1_ANJ1 (2)		A1_Mad3 (1) A1_MYT1 (1) A1_MYT2 (1)	A1_Mad3 (8) A1_Mad5 (2) A1_Mad6 (1) A1_Mad8 (1) A1_Mad9 (2) A1_Mad10 (2) A1_Mad12 (1) A1_Mad13 (1) A1_Mad14 (1) A1_Mad15 (2) A1_Mad16 (1) A4_Mad1 (1)
SWIO02*											A4_Mad2 (1)
SWIO03*							A1_Mad15 (2)				
SWIO04*										A1_MYT3 (1)	
SWIO05*								A1_Mad3 (1)			
SWIO06*									A1_Mad3 (1)		
AFR01		A1_a (1)									
AFR02*											
AFR03*											
AFR04*											
AFR05											
AFR06	A4_a (2)										
AFR07											
AFR08*											
AFR09											
AFR10*											
AFR11											
AFR12*					Z2_Sey1 (2)	Z2_Sey1 (2)					
AFR13									A1_Mad3 (1)		
EUR01*	M4_a (1)										
EUR02*											
EUR03											
EUR04*											
EUR05*		M7_MUS1 (2)									
EUR06*											
EUR07*			C1_a (2) C1_Rod1 (2)								
EUR08*											
EUR09		C1_a (3)									
EUR10*	C2_a (1)	C2_a (2)	C2_a (1)								
EUR11*			C2_a (1)								
EUR12*											
EUR13*	C2_b (1)										
EUR14	C2_c (2)										
EUR15	C2_d (2)										
EUR16*											

Table II-5 (following) : Distribution and occurrence of the 33 haplotypes of the partial ND2 gene for each African country.

	Egypt	Senegal	Chad	CAF	São Tomé	Gabon	Uganda	Tanzania	Malawi	Zimbabwe	Mozambique	South Africa
SWIO01*												
SWIO02*												
SWIO03*												
SWIO04*												
SWIO05*												
SWIO06*												
AFR01			A6_TCD1 (1)	A1_a (1)		A4_GAB1 (1)	A51_UGA1 (1)	A1_a (1) A1_b (1) A1_TZA1 (1)	A1_a (1)	A4_b (1) A4_c (3) A4_ZIM1 (1) A4_ZIM2 (2) A4_ZIM3 (1)	A1_MOZ1 (1)	A1_a (1) A4_b (2) A4_ZAF8 (1)
AFR02*				A1_CAF1 (2)								
AFR03*				A4_CAF1 (1)								
AFR04*											A1_a (1)	
AFR05												A4_ZAF1 (1) A4_ZAF2 (1) A4_ZAF3 (1)
AFR06				A4_a (1)	A4_a (2) A4_STP1 (1) A50_STP1 (1)			A4_a (1)				
AFR07		A4_SEN1 (1) A4_SEN2 (1)										
AFR08*						A1_GAB1 (2)				A4_b (1)		A1_a (1) A50_ZAF1 (1)
AFR09												
AFR10*												
AFR11	Z7_EGY1 (1)											
AFR12*		A1_Mad3 (2)							A1_Mad3 (1)			
AFR13									A1_Mad3 (1)			
EUR01*												
EUR02*												
EUR03												
EUR04*												
EUR05*												
EUR06*												
EUR07*												
EUR08*												
EUR09												
EUR10*												
EUR11*												
EUR12*												
EUR13*												
EUR14												
EUR15												
EUR16*												

Table II-5 (following) : Distribution and occurrence of the 33 haplotypes of the partial ND2 gene for each European country.

	Portugal	Spain	France	Germany	Switzerland	Italy	Greece
SWIO01*							
SWIO02*							
SWIO03*							
SWIO04*							
SWIO05*							
SWIO06*							
AFR01							
AFR02*							
AFR03*							
AFR04*							
AFR05							
AFR06							
AFR07							
AFR08*							
AFR09	A11_PRT2 (1) A14_PRT1 (1) A16_PRT1 (1)						
AFR10*	A1_b (1)						
AFR11							
AFR12*							
AFR13							C2_d (2)
EUR01*		M7'_a (1)	M4_a (4) M7'_a (2)				
EUR02*			M6_FRA1 (2)				
EUR03			M4_b (2)				
EUR04*						M3_a (1) M7_a (1) M7'_a (1)	
EUR05*							
EUR06*						M7_a (1)	
EUR07*							
EUR08*						C1_a (1)	
EUR09			C1_a (1)			C1_a (3)	
EUR10*							
EUR11*							
EUR12*			C2_b (1)	C2_b (1)			
EUR13*							
EUR14				C2_c (1)			
EUR15			C1_a (1)		C1_a (1)		
EUR16*				C2_DEU1 (1)			


SWIO populations
Madagascar
La Réunion
Mauritius
Rodrigues
Seychelles
Comoros
Continental populations
AFRICA A (COI-COII)
EUROPE M (COI-COII)
EUROPE C (COI-COII)
Madagascar A1_Mad3, A1_Mad5, A1_Mad6, A1_Mad8, A1_Mad9, A1_Mad10, A1_Mad12, A1_Mad13, A1_Mad14, A1_Mad15, A1_Mad16, A4_Mad1
La Réunion A1_Mad3, A1_Mad15, A1_REU1, A4_REU1
Mauritius A1_Mad3, A4_Mad1, A4_MUS1, A49_MUS1
Mahé A1_Mad3, A1_Sey1, A1_Sey2
Praslin A1_Mad3
La Digue A1_Mad3
Grande Comore A1_Mad3, A1_GCO1, A1_GCO2
Anjouan A1_Mad3, A1_Mad15, A1_ANJ1
Mayotte A1_Mad3, A1_MYT1
SWIO01
Madagascar A4_Mad2
SWIO02
Grande Comore A1_Mad15
SWIO03
Mayotte A1_MYT3
SWIO04
Anjouan A1_Mad3
SWIO05
A. mellifera Kenya [KJ396186]
A. mellifera Kenya [KJ396183]
Chad A6_TCD1
Central African Republic A1_a
Gabon A4_GAB1
Uganda A51_UGA1
Tanzania A1_a, A1_b, A1_TZA1
Malawi A1_a
Zimbabwe A4_b, A4_c, A4_ZIM1, A4_ZIM2, A4_ZIM3
Mozambique A1_MOZ1
South Africa A1_a, A4_b, A4_ZAF8
Mauritius A1_a
A. mellifera Kenya [KJ396188, KJ396189]
A. m. scutellata Africanized [KJ601784]
A. m. scutellata South Africa [U35764]
A. m. adansonii Nigeria [U35743]
AFR01
Central African Republic A1_CAF1
AFR02
Central African Republic A4_CAF1
AFR03
Mozambique A1_a
AFR04
A. mellifera Kenya [KJ396187]
A. mellifera Africanized Brazil [U35746]
South Africa A4_ZAF1, A4_ZAF2, A4_ZAF3
A. mellifera Kenya [KJ396182]
A. m. monticola Kenya [U35761]
A. mellifera africanized Brazil [U35745]
A. m. capensis South Africa [U35747]
AFR05
São Tomé Island A4_a, A4_STP1, S50_STP1
Central African Republic A4_a
Tanzania A4_a
La Réunion A4_a
A. mellifera Kenya [KJ396190, KJ396184]
A. m. scutellata Kenya [U35763]
AFR06
Senegal A4_SEN1, A4_SEN2
A. m. adansonii Senegal [U35744]
AFR07
Gabon A1_GAB1
Zimbabwe A4_b
South Africa A1_a, A50_ZAF1
AFR08
Portugal A11_PRT2, A14_PRT1, A16_PRT1
A. m. iberiensis (iberica) Portugal [U35750]
A. m. sahariensis Morocco [U35762]
A. m. siciliana (sicula) Italy [U35765]
A. m. intermissa Algeria [KM458618]
AFR09
Portugal A1_b
AFR10
A. m. intermissa Morocco [U35751]
A. mellifera Kenya [KJ396191, KJ396185]
A. m. syriaca Jordan [KP163643]
Egypt Z7_EGY1
A. m. lamarckii Egypt [U35753]
AFR11
Malawi A1_Mad3
Senegal A1_Mad3
Praslin Z2_Sey1
La Digue Z2_Sey1
AFR12
Mohéli A1_Mad3
SWIO06
Malawi A1_Mad3
Greece C2_d
Mohéli A1_Mad3
A. m. meda Syria [U35756]
A. m. syriaca Syria [AY618920]
AFR13
A. m. mellifera France [U35758]
Spain M7'_a
France M4_a, M7'_a
La Réunion M4_a
EUR01
France M6_FRA1
EUR02
France M4_b (H34)
EUR03
A. m. mellifera Norway [U35760]
A. m. mellifera Spain [U35759]
Italy M3_a, M7_a, M7'a
EUR04
Mauritius M7_MUS1
EUR05
Italy M7_a
EUR06
A. m. siciliana (sicula) Italy [AY114493]
A. m. ligustica Italy [U35753]
Rodrigues C1_a, C1_ROD1
EUR07
Italy C1_a
EUR08
France C1_a
Italy C1_a
Mauritius C1_a
A. m. ligustica Italy [U35754, L06178]
EUR09
La Réunion C2_a
Mauritius C2_a
Rodrigues C2_a
A. m. pomonella Tien Shan [AY136625]
A. m. adami [AY114501]
A. m. pomonella Tien Shan [AY136623]
EUR10
Rodrigues C2_a
EUR11
A. m. carnica Serbia [JQ778304]
France C2_b (H32)
Germany C2_b (H32)
EUR12
La Réunion C2_b
EUR13
A. m. carnica Austria [U35749]
A. m. cypria Cypria [AY618910, AY618911]
Germany C2_c
La Réunion C2_c
EUR14
A. m. carnica Slovenia [U35748]
A. m. anatoliaca Turkey [AY618919]
France C1_a
Switzerland C1_a
La Réunion C2_d
A. m. carnica Serbia [JQ778305]
A. m. macedonica Greece [U35755]
A. m. cecropia Greece [AY114505]
A. m. pomonella Tien Shan [AY136624]
EUR15
Germany C2_DEU1
A. m. meda Syria [U35757]
EUR16
A_I
A_III
Z
M
C
0.01

Among the 33 ND2 sequences detected, six were exclusive to the SWIO islands (SWIO01-06) in addition Madagascar and each island of the Comoros archipelago possessed a private sequence. African populations presented 11 haplotypes including four that have been detected in SWIO. In the other hand, European populations showed 16 haplotypes including eight ones that have been retrieved in the Mascarenes. Portugal was intermediate as located in Europe but having proper African ND2 sequences (AFR09-10). A total of 20 ND2 sequences were associated with only one COI-COII profile such as SWIO02 and A4_Mad2 from Madagascar (Table II-5). The SWIO01 ND2 sequence was associated with 23 COI-COII ST which was the largest observed number. However a same COI-COII profile could be associated with several ND2 ST such as A1_a sequence detected in individuals bearing AFR01, AFR04 or AFR08 (Table II-5).

The Approximate-Maximum-Likelihood (AML) tree using GTR model exhibited three separate phylogenetic groups which corresponded to the evolutionary lineages A, C and M based on COI-COII STs (Figure II-3). The African ND2 group contained all COI-COII detected maternal sub-lineages (Tropical A_I, Atlantic A_{III} and Z). The African A group was constituted of a SWIO clade (SWIO01-05) and another larger clade gathering all African continental populations (AFR01-13) but also SWIO islands with Mohéli (SWIO06 and AFR13), Praslin and La Digue (AFR12). This A SWIO clade was well-supported by 94% of bootstraps and was mostly the same as observed at the COI-COII intergenic loci. According to the AML tree, A_I sub-lineage sequences solely observed in Mascarene (A1_REU1, A4_REU1, A4_MUS1 and A49_MUS1), Seychelles (A1_Sey1-2) and Comoros archipelagos (A1_GCO1-2, A1_ANJ1, A1_MYT1-3) were closely related to *A. m. unicolor* COI-COII

← **Figure II-3** : Approximately-Maximum-likelihood phylogenetic tree from alignment of partial ND2 sequences (610pb) of *Apis mellifera*. Model used was GTR+CAT from FastTree and were based on 166 sequences, including 49 references sequences from GenBank (in bracket). For each ND2 sequence type, origin of the sample is indicated (SWIO islands, African or European countries) and highlighted by a color. Additionally, the COI-COII sequence name is also specified for each island or country taxon. Doubles sequences (or more) having the same origin and same COI-COII sequence identity were removed, see Table II-5 for details. African (A and Z sub-group) and European (M and C) evolutionary groups based on COI-COII mtDNA sequences are represented by vertical lines. Bootstraps are indicated near node and in red.

sequence diversity observed in Madagascar (endemic range). (Figure II-3). In Comoros, Mohéli individuals (also having only A1_Mad3 sequence) were not grouped in the A SWIO clade; one was genetically closer to *A. m. syriaca* and *A. m. meda* sequences and others and the other was closer to Z lineage from Praslin and La Digue. In La Réunion, two individuals were grouped with *A. m. scutellata* and were closely related to *A. m. adansonii*. This was consistent with the COI-COII profile as they had A4_a which was not observed in *A. m. unicolor* populations (Figure II-2 and Table II-4). Same observation was led for one individual in Mauritius (A1_a) clustered in another *A. m. scutellata/A. m. adansonii* subgroup. The classification of African subspecies based only on ND2 sequences seems difficult as some phylogenetic groups gathered individuals from up to four subspecies natural range (Figure II-3). The only African subspecies forming monophyletic clades were *A. m. capensis*, *A. m. intermissa*, *A. m. lamarckii* and *A. m. unicolor.*

In parallel, the European M group was well distinguished from the C evolutionary lineage group (which also included O lineage subspecies sequences) and both from the A group (Figure II-3). Within the M group of the ND2 tree, the individual from La Réunion having M4_a sequence (COI-COII) was clearly grouped with *A. m. mellifera* sequences. However, Mauritius individuals with M7_MUS sequence (COI-COII) were clustered with *A. m. ligustica* sequences (Figure II-3). Concerning the C group, the ND2 region polymorphism was not enough to differentiate the C and O evolutionary lineages subspecies: some individuals from *A. m. carnica* were grouped with *A. m. macedonica*, *A. m. cecropia* and even *A. m. pomonella.* Nonetheless, it was possible to notice that *A. m. ligustica* from Rodrigues was placed in a different clade than *A. m. ligustica* sequences from Mauritius (Figure II-3). Moreover, one individual from La Réunion bearing C2_b sequence (COI-COII) had a ND2 sequence highly similar to *A. m. carnica* and was separated from C2_b sequences detected in France and Germany colonies (only 17% of bootstraps replicated).

4. Discussion

The COI-COII intergenic region has been widely used to detect evolutionary lineages and study the genetic diversity in honeybee (Meixner *et al.*, 2013). On the other hand, diversity of the ND2 region has been less assessed and was essentially used to detect subspecies (Arias and Sheppard, 1996, Muli *et al.*, 2014, Ilyasov *et al.*, 2011). The sequencing of the COI-COII (n = 1184) and ND2 region (n = 170) in the SWIO islands and comparisons with African and European sequence diversity have confirmed that African lineage and especially *A. m. unicolor* were present in the Mascarene (La Réunion, Mauritius), Comoros (Grande Comore, Anjouan, Mayotte) and in Seychelles (Mahé, Praslin, La Digue) archipelagos. The predominance of sequences types (COI-COII and ND2) characteristics of *A. m. unicolor* could indicate that honeybee populations from the three SWIO archipelagos mainly derived from the Madagascar genetic pool. Nonetheless, the observed mitochondrial diversity also highlighted introduction events of exotic European subspecies.

In the SWIO area, colonies from Madagascar and Comoros islands (Grande Comore, Anjouan, Mohéli and Mayotte) exclusively belong to the tropical African sub-lineage A_I. The Seychelles archipelago was also from African A_I origin but Z lineage was also described in Praslin and La Digue with COI-COII marker (Techer *et al.*, 2015a). The Mascarenes rather exhibited several maternal origins with three evolutionary lineages detected including African A and both European C and M. Nonetheless, striking differences were observed in composition patterns. The honeybee from Rodrigues was exclusively represented by C lineage (Techer *et al.*, 2015b). On the contrary, the African lineage was dominant in La Réunion (95.4%) while European lineages were far behind (3.8% of C and 0.8% of M). In Mauritius, similar proportions were detected between African (56.1%) and European (42.3% of C and 1.7% of M) lineages. Sequencing of the ND2 and COI-COII regions has confirmed previous detection of these three evolutionary lineages in the La Réunion and Mauritius (Techer *et al.*, in prep. **Chapitre 4**).

The detection of European sequences in the Mascarene archipelago confirmed the past reported introductions (Ayme, 2014, Jhumun, 2011). Nonetheless, the differences in proportion could be explained by different importations policies. The highest proportion of exotic C and M lineages were found in Mauritius and Rodrigues which were also the only islands importing commercial strains until 2011 (Jhumun, 2011). In La Réunion, importation has been forbidden since 1982 to avoid parasites and pathogens introduction so the presence of C and M lineage could be traces of importation before that limitation, or might also be evidences of recent non reported introductions.

In Madagascar, *A. m. unicolor* population has been shown to have a low level of nuclear diversity but high polymorphism in the mtDNA COI-COII region with 16 STs detected (n = 173 colonies) (Rasolofoarivao *et al.*, 2015). One particular sequence A1_MAD3 was found dominant in all islands of the SWIO at the exception of Rodrigues. As this sequence was also detected in Africa, it can be supposed that A1_MAD3 i) appeared by homoplasy in geographical distant populations from the African continent and Madagascar, or ii) was present in African populations of origin that colonized Madagascar. However, the dominance of A1_MAD3 in Madagascar favored a bottleneck event in which first individuals that colonized the island had this sequence and then spread all over it. Besides, this hypothesis is supported by the star-like pattern observed in COI-COII haplotype network in Madagascar. This pattern is typical of single colonization event followed by demographic expansion in islands from a continental population of origin such as in the endemic bat *Nyctalus azoreum*, for which ancestor likely have colonized the Azores islands from continental European populations in the Pleistocene (Salgueiro *et al.*, 2004, Salgueiro *et al.*, 2007). The star-like network associated with phylogeny of *Cyt b* and 12S rRNA in the study of *Tarentola* geckos genetic diversity indicated a long oceanic dispersal event from Canary Islands to Cape Verde archipelago (Vasconcelos *et al.*, 2010). In the SWIO, all observed A1 derived sequences may have radiated from A1_MAD3, indicating that since the island colonization the maximum mutations steps reached five deletions. Regarding that, it is interesting to notice that all SWIO islands had at least one private A1 sequence, still highly similar to Malagasy ones.

Enough divergence in mitochondrial lineages was detected to be explained by ancient colonization of honeybees from Madagascar into SWIO archipelagos. The sequencing of ND2 region was useful to detect and confirmed *A. m. unicolor* presence which was divergent from all other African sequences. This corroborates studies that have shown that *A. m. unicolor* was genetically differentiated from the other African subspecies (Han *et al.*, 2012, Whitfield *et al.*, 2006). Continental African populations (South Africa and Mozambique) neighboring SWIO islands showed coding sequences with a nucleotide divergence which varied from 0.96% to 1.76%. In comparison Arias and Sheppard (1996) found a weaker divergence rate of 0,42% (± 0,23) within the South African region (*A.m. adansonii, A.m. capensis, A.m. monticola et A.m. scutellata*) and a maximum rate of 1,71% (± 0,19) among African and European subspecies ND2 sequences. The mutation rate for mtDNA in *Apis mellifera* is unknown but by applying the calibrated rate of *Drophila* (2% per million years (Myr) (DeSalle *et al.*, 1987)), A_I continental and insular SWIO sub-lineages might have diverged from 0.48 to 0.64 Myr. Nonetheless, date time of the populations and lineages splits should be more recent as the mtDNA has been shown to evolve more quickly in Hymenoptera than in Diptera (Castro *et al.*, 2002) and in *Apis* than in *Drosophila* (Crozier *et al.*, 1989).

Study of the mitochondrial COI-COII and ND2 diversity allowed detecting for the first time evidence of African continental colonies of non-reported introductions in the SWIO. Nevertheless, the previously supposed introduction of African Z sub-lineage in Seychelles (Techer *et al.*, 2015a) now remained questionable. Indeed, the phylogeny of ND2 sequences brings out the presence of Z sub-lineage also in Mohéli (Comoros). To our knowledge, beekeeping is poorly developed in Comoros archipelago and so human importation is unlikely. The particular colonies of Mohéli (COI-COII: A1_Mad3 and ND2: SWIO06 and AFR13) might originated from the East Coast of Africa which constitute a contact area between A_I and Z sub-lineages (Franck *et al.*, 2001, Alburaki *et al.*, 2011) and bring into the island by oceanic dispersal (hurricanes, flight abilities …).

In order to confirm these speculations, it is necessary to better known the potential source populations such as Malawi (according to ND2 tree and COI-COII sequences). Regarding the young geological history of the islands, the time

divergence split of subspecies (dated between 1.3 million to 13 000 years (Arias and Sheppard, 1996, Garnery *et al.*, 1992, Wallberg *et al.*, 2014)), the variation of ocean levels; honeybee could have colonized Comoros from the African East coast and then following a *stepping-stone* model colonized Seychelles archipelago. So, African honeybees from Comoros and Seychelles may not only originate from Madagascar but probably also from *A. m. litorea*. The COI-COII sequence network supported that Comoros archipelago formed a natural contact interface between continental African subspecies and insular *A. m. unicolor*. The mitochondrial diversity divergence among SWIO islands was coherent with the previous genetic differentiation observed with 14 microsatellites, even if the insular populations were closely related than with African and European continental populations (Techer *et al.*, in prep. **Chapitre 4**).

European lineages presence in the Mascarene underlines the impact of human on insular populations. *A. m. ligustica* colonies were detected in Mauritius validating the report of recent introduction from commercial strains in Australia (Chapman *et al.*, 2008, Chapman *et al.*, 2015). Using only COI-COII, *A. m. ligustica* colonies from Mauritius were not differentiated from the one in Rodrigues, yet Italian queens from USA have been reported to be introduced in Rodrigues 49 generations ago (Techer *et al.*, 2015b). Sequencing of the ND2 permitted to detect difference in maternal origins so that *A. m. ligustica* in Mauritius is not exactly the same as in Rodrigues even if they are connected for commercial exchanges. In La Réunion, no *A. m. ligustica* colonies have been detected even if past importations have been recorded (Ayme, 2014). If no Italian honeybee were retrieved in La Réunion, *A. m. carnica* sequences (ND2 and COI-COII) have been observed and one of them was detected in all islands of the Mascarene. This result could reveal ancient beekeeping exchanges practiced during colonial period, when imported queens in La Réunion were also transported to Mauritius and then Rodrigues on the route to India (Bappoo and Ramanah, 1989). Finally, *A. m. mellifera* has been reported in La Réunion both with characteristic COI-COII and ND2 sequences.

This subspecies was also introduced in the past but was found really rare in the island. The diversity of ND2 sequences indicated several introductions from different locations and/or commercial stocks. This diversity was contrasting with the

natural diversification pattern of African lineage and highlight effects of introduction in raising genetic diversity in islands (Bock *et al.*, 2014).

5. Acknowledgements

We would like to thank Patrick Turpin and Thomas François for the great sampling word done in La Réunion. We also greatly thank Rémy Baudin of the ADARA, Pascal Rousse, Brice Tocko, Maulid W. Mwatawala, Fabian Pillet, Nicolas Odaglia, Yves Leconte, Pierre Franck, Jérémy Bouyer, Fani Hatjina and the beekeeper of Bemlhevai for providing African and European samples. A great thank to Azali H. Abdoui and Antoine Franck for collecting Comoros samples and Olivier Esnault for additional samples from Mauritius and the Seychelles. We are also grateful to the beekeepers of La Réunion and Mauritius for their participation to this study. Finally we warmly thank both entomological teams of Mauritius (Krish Permalloo, Sookar Preeaduth, G. Jhumun and M Jamalkhan) and Rodrigues (Jerome Félicité and Nicolas Volbert) and the Seychelles Agricultural Agency (Gilbert Portlouis and Margareta) for helping in sampling in the SOOI. Maéva A. Techer is recipient of a Ph.D fellowship of the Sciences and Technology Doctoral School of the University of La Réunion. This study was partially funded by CIRAD and the Enlargement and sustainability of the Plant Protection Network (e-PRPV) supported by the European Union, the French government, the Région Réunion and the Département of la Réunion.

Planche de vol d'une colonie exploitée à Rodrigues avec différents phénotypes de couleur

III) Chapitre 2 : Caractérisation génétique de la population d'abeille (*Apis mellifera*) sur l'île de Rodrigues par l'utilisation de marqueurs microsatellites et mitochondriaux‡‡

Maéva Angélique Techer, Johanna Clémencet, Patrick Turpin, Nicolas Volbert, Bernard Reynaud, Hélène Delatte

Résumé

L'abeille domestique est présente à Rodrigues, une île du Sud-Ouest de l'océan Indien. L'histoire démographique de la population d'abeille qui y est établie est très mal connue et sa diversité génétique n'a jamais été étudiée. Dans la présente étude, les origines maternelles d'*A. mellifera* à Rodrigues ont été évaluées avec le test PCR-RFLP *DraI* et le séquençage de la région intergénique COI-COII de l'ADN mitochondrial. La diversité génétique nucléaire a été estimée à l'aide de 18 marqueurs microsatellites. Un total de 524 colonies ont été échantillonnées dans le cheptel exploité de 16 apiculteurs et ce sur 20 sites différents.

La diversité mitochondriale de la population de Rodrigues a montré une absence de la lignée évolutive africaine et a été caractérisée par la présence de trois haplotypes européens de la lignée évolutive C. L'haplotype le plus fréquent dans la population est C1 (81,3%), suivi de C2 (18,0%) tout deux étant reconnus comme caractéristiques des sous-espèces *A. m. ligustica* et *A. m. carnica*, respectivement. Un nouvel haplotype C1_Rod1 a été retrouvé mais en faible fréquence (0,7%). Aucune structure génétique n'a été détectée mais le niveau de diversité génétique de cette

‡‡‡‡ **Ce chapitre a fait l'objet d'une publication dans la revue *Apidologie* en 2015** (facteur d'impact de 1,676).

population insulaire était comparable à celles de populations continentales européennes. Selon les analyses avec la méthode ABC, les scénarios de goulots d'étranglement étaient les plus probables.

Mots clés : tropical, insulaire, analyses moléculaires, méthode ABC, apiculture

Genetic characterization of the honeybee (*Apis mellifera*) population of Rodrigues Island, based on microsatellite and mitochondrial DNA

Maéva Angélique Techer[1,2], Johanna Clémencet[1], Patrick Turpin[2], Nicolas Volbert[3], Bernard Reynaud[2], Hélène Delatte[2]

[1] Université de La Réunion, UMR PVBMT F-97715 Saint Denis cedex 9, La Réunion, France

[2] CIRAD, UMR PVBMT, 7 chemin de l'Irat, Ligne Paradis, 97410 Saint Pierre, La Réunion, France

[3] Apicultural Services, Rodrigues Regional Assembly - Agriculture, Citronnelle, Rodrigues

Abstract

Apis mellifera is present in Rodrigues, an island in the South-West Indian Ocean. The history of the established honeybee population is poorly known and its biodiversity has never been studied. In this study, maternal origins of *A. mellifera* in Rodrigues have been assessed with the *DraI* test and sequencing of the mitochondrial COI-COII region. Nuclear genetic diversity was investigated with 18 microsatellite markers. A total of 524 colonies were sampled from 16 beekeepers in 20 sites.

The Rodrigues population was characterized by the absence of the African lineage and presence of three European haplotypes from the C lineage. C1 haplotype was the most frequent (81.3%) followed by C2 (18.0%) (characteristics of *A. m. ligustica* and *carnica,* respectively) and a new haplotype, C1-Rod (0.7%). No genetic structure was detected and genetic diversity was comparable to continental populations. According to ABC analyses, bottleneck scenarios are most likely to have occurred.

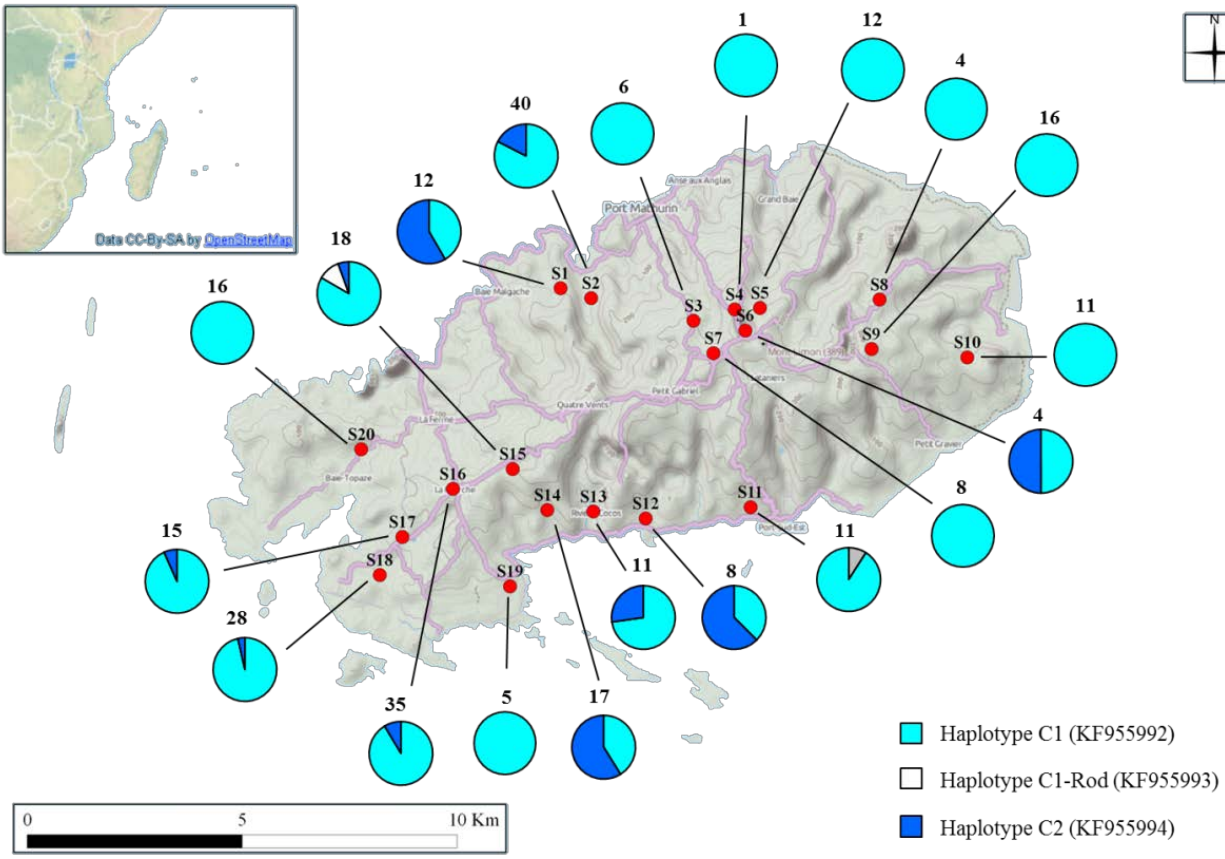
Key words: tropical, insular, molecular analyses, ABC method, beekeeping

1. Introduction

During the past decade, honeybee populations have experienced declines and colony losses are continually reported in Europe and the United States (vanEngelsdorp and Meixner, 2010, Chauzat *et al.*, 2013). The reduction of genetic diversity due to beekeeping practices is one of the several causes suggested (Oldroyd, 2007) and has had an important impact on managed colonies (De la Rúa *et al.*, 2013). Studies have demonstrated that reduced levels of intra-colonial genetic diversity affect colony fitness (Tarpy *et al.*, 2013).

In its endemic area, *Apis mellifera* has evolved into at least 28 described subspecies (Ruttner, 1988, Sheppard and Meixner, 2003, Meixner *et al.*, 2011, Meixner *et al.*, 2013) which have been grouped into four evolutionary branches using morphometric analysis (Ruttner, 1988): the European North-Mediterranean (C) and the West-Mediterranean (M) lineages, the Oriental O lineage and the African A lineage. The breakdown of the different evolutionary lineages is supported by molecular analyses (Garnery *et al.*, 1992, Whitfield *et al.*, 2006, Wallberg *et al.*, 2014). The European subspecies *A. m. ligustica* and *A. m. carnica* (C lineage) have been introduced worldwide because of their commercially desirable traits and have succeeded in adapting to new habitats (Chapman *et al.*, 2008, Delaney *et al.*, 2009).

In the South-West Indian Ocean, *A. m. unicolor* (Latreille, 1804) has been described as an endemic subspecies from Madagascar and belongs to the African lineage (Ruttner, 1988). Honeybees are also established in the Mascarene archipelago (East of Madagascar) comprising La Réunion, Mauritius and Rodrigues (Ruttner, 1988). Rodrigues was discovered early in the 16th century, on the route to India (North-Coombes, 1971). It is not known whether *A. mellifera ssp.* was already present on the island before colonization. Controlled imports of honeybee queens are thought to have started in the 1930s, and around 1500 traditional hives were identified in the 1940s and 50s (Bappoo and Ramanah, 1989). In 1981, 11 European queens were reported to have been introduced to Rodrigues from the United States (Bappoo and Ramanah, 1989).



Site	Beekeeper - Apiary	Location	$N_{colonies}$
S1	B16	Allée Tamarin	19
S2	B1 - c	Baie Aux Huîtres	42
S3	B4	Soupirs	17
S4	B1 - a	Citronelle	2
S5	B2	Cygangue	22
S6	B12	Mont Lubin	12
S7	B3	Malabor	20
S8	B1 - b	Trèfles	12
S9	B14	Coromandel	32
S10	B15	Montagne Cabris Est	19
S11	B13	Songe	19
S12	B11	Anse Raffin	17
S13	B10	Rivière Cocos	27
S14	B9	Ile Michel	35
S15	B5 - c	Maréchal	49
S16	B7	La Fouche	64
S17	B6	Cascade Jean Louis	16
S18	B5 - b	Anse Quitor	52
S19	B8	Petite Butte	7
S20	B5 - a	Baie Topaze	41

Figure III-1 : a) Distribution of the mitochondrial sequences on the 20 sampled sites of Rodrigues. Number of individuals sequenced by site is indicated in the top of each diagram. b) Details on beekeeper apiaries.

In 2002, the Rodrigues government restricted honeybee importation (Rodrigues apicultural services, unpubl. data). In 2010, 2251 managed colonies from 173 beekeepers were identified (Belmin, 2010). Since human colonization of the island, extensive habitat degradation has occurred with the total loss of the original forest (Thébaud *et al.*, 2009).

In the Mascarene, mitochondrial diversity of honeybees had been investigated in La Réunion (n = 20) and Mauritius (n = 10) and A_I was the sole sub-lineage detected (Franck *et al.*, 2001). This study aims to describe the genetic diversity of the honeybee population in Rodrigues using molecular tools. First, the evolutionary lineages and subspecies were investigated using the mitochondrial COI-COII intergenic region. Then, the level of nuclear genetic diversity and its structure was investigated with microsatellites markers. Finally, we attempted to detect a bottleneck event, date it, and estimate effective population size before, during and after the event.

2. Materials and Methods

2.1. Sampling and DNA extraction

The study was conducted on the island of Rodrigues (18.3 km long and 8.5 km wide) (Figure III-1). In February 2013, a total of 524 managed colonies belonging to 16 beekeepers were sampled from 20 different sites (Figure III-1). One worker was collected from the entrance to each colony. Honeybees were preserved in ethanol (95 %) and kept at -20 °C until molecular analysis. Each worker was analyzed for both mitochondrial and microsatellite markers. Total DNA isolation was performed from the six legs of each individual following the Garnery et al. (1993) method with slight modifications.

2.2. Mitochondrial DNA analysis

Mitochondrial analysis was carried out following Garnery et al. (1993). This consisted of PCR amplification of the intergenic COI-COII region using E2 and H2 primers, followed by a restriction of the amplified product with the *DraI* enzyme (*Promega*).

Table III-S1 : Microsatellite *loci* information with indication of multiplex group (Mix 1 to 4), original marker name by Solignac et al. (2003), name of primers used for the study, primer's nucleotide sequence, microsatellite motive repeated, fluorochrome, range of detected allele size and N_{Allele}, the number of detected alleles for all individuals in Rodrigues (n = 524). Markers removed from the analysis are presented in gray.

Multiplex group	Original marker name	Name of primer	Nucleotide sequence	Motive	Fluorochrome	Range of allele size (bp)	N_{Allele}
Mix 1	A113	A113-F	5'- CTCGAATCGTGGCGTCC -3'	$(TC)_5TT(TC)_8TT(TC)_5$	VIC	202 - 234	8
		A113-R	5'- CCTGTATTTTGCAACCTCGC -3'				
	A024	A24-F	5'- CACAAGTTCCAACAATGC -3'	$(CT)_{11}$	FAM	92 - 106	6
		A24-R	5'- CACATTGAGGATGAGCG -3'				
	AC306	Ac306-a	5'- GAATATGCCGCTGCCACC -3'	$(CT)_{11}$	FAM	165 - 185	6
		Ac306-b	5'- TTTCGTTGCATCCGAGCG -3'				
	AP055	Ap55-1	5'- GATCACTTCGTTTCAACCGT -3'	$(TC)_9..(TC)_{12}$	PET	147 - 207	8
		Ap55-2	5'- CATTCGGTATGGTACGACCT -3'				
	AP081	Ap81-1	5'- GGATCGTCGAGGCGTTGA -3'	$(GT)_8$	NED	124 - 136	4
		Ap81-2	5'- GAAAAGTATTCCGCCGAGCA -3'				
Mix 2	A107	A107-1	5'- CCGTGGGAGGTTTATTGTCG -3'	$(CT)_{23}$	VIC	138 - 184	15
		A107-2	5'- GGTTCGTAACGGATGACACC -3'				
	A029	A29-2	5'- CAACTTCAACTGAAATCCG -3'	$(CA)_{24}$	NED	128 - 175	15
		A29-1	5'- AAACAGTACATTTGTGACCC -3'				
	A088	A88-F	5'- CGAATTAACCGATTTGTCG -3'	$(CT)_{10}..(GGA)_7$	VIC	136 - 149	5
		A88-R	5'- GATCGCAATTATTGAAGGAG -3'				
	AP273	Ap273-a	5'- GATCTTGTGTTAAACAGCCG -3'	$(CT)_8$	PET	106 - 110	3
		Ap273-b	5'- GATCTCTGGCAGACGAAGAG -3'				
	A028	A28-F	5'- GAAGAGCGTTGGTTGCAGG -3'	$(AG)_6(GAG)_6$	FAM	128 - 134	4
		A28-R	5'- GCCGTTCATGGTTACCACG -3'				
	AP289	Ap289-a	5'- AGCTAGGTCTTTCTAAGAGTGTTG -3'	$(GA)_5$	NED	174 - 228	10
		Ap289-b	5'- TTCGACCGCAATAACATTC -3'				
	A124	B124-1	5'- GCAACAGGTCGGGTTAGAG -3'	$(CT)_8..(CT)_{14}..(GGCT)_8$	PET	216 - 232	7
		B124-2	5'- CAGGATAGGGTAGGTAAGCAG -3'				
Mix 3	A035	A35-1	5'- GTACACGGTTGCACGGTTG -3'	$(GT)_{14}$	FAM	94 - 123	10
		A35-2	5'- CTTCGATGGTCGTTGTACCC -3'				
	A008	A8-1	5'- CGAAGGTAAGGTAAATGGAAC -3'	$(GA)_{15}...(GCTCG)_5$	VIC	165 - 181	6
		A8-2	5'- GGCGGTTAAAGTTCTGG -3'				
	AP033	Ap33-1	5'- TTTCTTTTTGTGGACAGCG -3'	$(CT)_{15}$	PET	225 - 247	10
		Ap33-2	5'- AAATATGGCGAAACGTGTG -3'				
Mix 4	AP043	Ap43-1	5'- GGCGTGCACAGCTTATTCC -3'	$(TA)_6GATA(GA)_{10}$	FAM	129 - 183	11
		Ap43-2	5'- CGAAGGTGGTTTCAGGCC -3'				
	AP066	Ap66-1	5'- TTGCATTCGGTCTCCAGC -3'	$(CT)_{11}$	VIC	90 - 102	5
		Ap66-2	5'- ACTTGCCGCGGTATCTGA -3'				
	A043	A43-1	5'- CACCGAAACAAGATGCAAG -3'	$(CT)_{12}$	PET	124 - 154	8
		A43-2	5'- CCGCTCATTAAGATATCCG -3'				

PCR reaction was performed in a volume of 15 µL containing 2 mM $MgCl_2$, 2 mM dNTPs, buffer 5X (*Promega*), 20 pmol of each primer, 30 units of *GoTaq Flexi* ® *Promega*, 0.5 µL of DNA at 5 ng/µl. Samples underwent initial denaturation for 5 min at 92°C, 35 cycles of 30s at 92 °C, 45s at 48 °C, 2 min at 62 °C, and a final elongation step of 7 min at 92°C. *DraI* digestion was performed according to manufacturer recommendations (*Promega*). Restriction fragments were separated in 5% agarose MetaPhor gels.

The mtDNA intergenic COI-COII region was sequenced in at least 30% randomly selected individuals within each sample site, using the same E2-H2 primers. Individuals exhibiting rare restriction profiles were systematically sequenced. Sequence checking and alignment was done using Mega 5.1 software (Tamura *et al.*, 2011) and then blasted on NCBI GenBank. All newly detected sequences were submitted to the GenBank database.

2.3. Microsatellite DNA analysis

A total of 18 polymorphic microsatellite *loci* (Estoup *et al.*, 1994, Estoup *et al.*, 1995b, Franck *et al.*, 1998, Solignac *et al.*, 2003) were scored A113, A24, AC306, AP55, AP81, A107, A29, A88, AP273, A28, AP289, B124, A35, A8, AP33, AP43, AP66 and A43 (Table III-S1). Primers were distributed into four multiplex PCR reactions (Table III-S1). PCR reactions were performed in 10 µL volumes containing 5 µL of Master Mix Type-it 2X *Qiagen*, 0.2 µL of each primer at 20 pmol/µL, and 1 µL of DNA at 5 ng/µl. All programs started with a denaturing cycle at 94° for 5 min, followed by 35 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at 52°C, 45 s at 72°C, and a final elongation at 72°C for 20 min, except for Mix 1 where annealing was done at 55°C. The samples were run through DNA sequencer ABI Prism 3130xL and alleles were scored using Genemapper 4.0 (*Applied Biosystems*).

As a preliminary analysis, Micro-Checker 2.2.3 (Van Oosterhout *et al.*, 2004a) was used to identify genotyping errors. The frequency of null alleles per *locus* was estimated with FreeNa (Chapuis and Estoup, 2007) based on 1000 bootstrap replicates.

Table III-1 : Parameter names of all four scenarios used in DIYABC software prior values minimum and maximum, posterior parameter estimate values (mode as point of estimation) and 95% confidence interval, relative bias and relative square root error.

Parameter name	Prior values range	Posterior parameter values	95% Confidence interval	Relative bias	Relative square root error
Population size effective					
N_1	[2 – 2000]	760	[333 – 1840]	-0.241	0.491
N_{anc}	[5000 – 10000]	7463	[5470 - 9840]	-0.005	0.232
N_b	[2 – 100]	60	[20 – 95]	0.441	0.522
Time in generation					
t	[2-100]	19	[7 – 95]	0.592	1.785
d_b	[2-50]	30	[9 – 47]	-0.071	0.407
Genetic parameters (rate)					
μ_{mic}	[1×10^{-4} – 1×10^{-3}]	1×10^{-3}	[4.0×10^{-4} – 1.0×10^{-3}]	-0.0561	0.314
p_{mic}	[1×10^{-1} – 3×10^{-1}]	3×10^{-1}	[1.4×10^{-1} – 3.0×10^{-1}]	-0.0044	0.342
sn_{mic}	[1×10^{-8} – 1×10^{-5}]	1×10^{-8}	[1.3×10^{-8} – 5.7×10^{-6}]	-0.9977	0.997

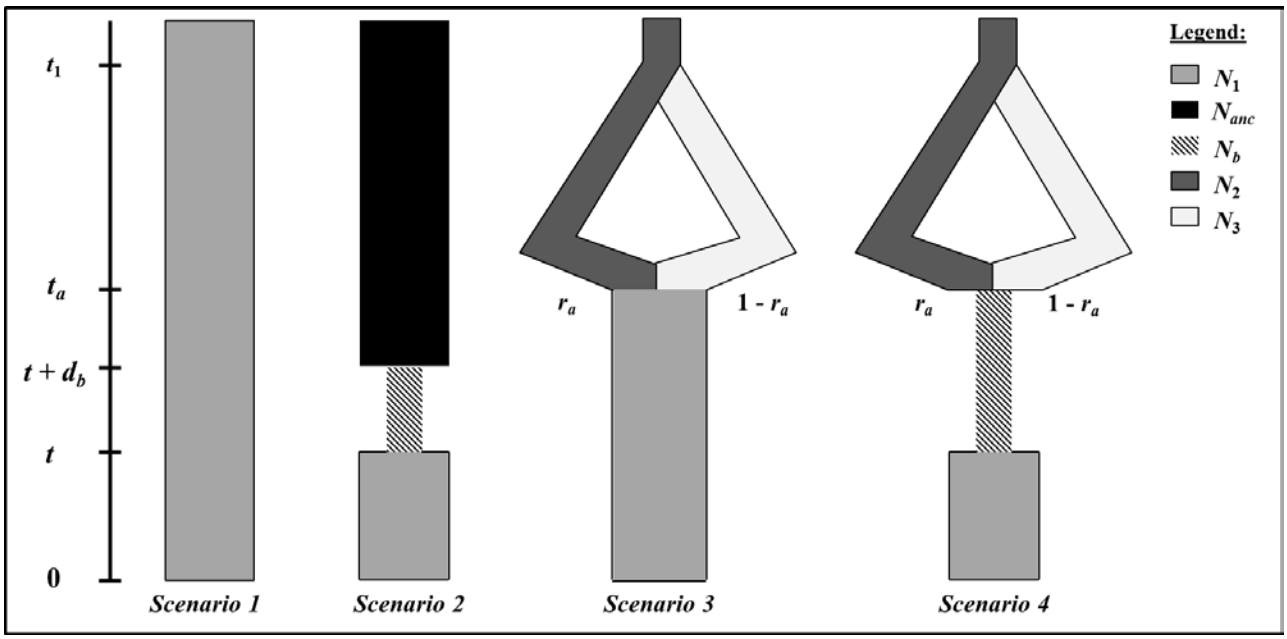


Figure III-2 : Schematic drawing of the 4 scenarios used for the ABC method.

For each site with N ≥ 10 colonies, microsatellite diversity was estimated through mean number of alleles (N_a), observed (H_{obs}) and unbiased expected heterozygosity (H_e) (Nei, 1978) with GENETIX 4.05 (Belkhir *et al.*, 1996). Allelic richness (Ar) per site was calculated with FSTAT 2.9.3.2 (Goudet, 2001a) using the rarefaction method. Heterozygosity excess or deficit was estimated by calculating F_{IS} according to Weir & Cockerham (1984). Deviations from the Hardy Weinberg equilibrium (HWE) and linkage disequilibrium were tested using GENEPOP 3.4 (Raymond and Rousset, 2004). False discovery rate (FDR) estimators (q-value) were calculated for probability values of repeated comparisons, using the R package QVALUE (Dabney *et al.*, 2004). Pairwise F_{ST} values were calculated for all combinations of the 18 sites (with N ≥ 10 colonies) and tested using permutations with FSTAT (Goudet, 2001a). Population structure and assignment of individuals to clusters were inferred using a Bayesian model-based clustering method with STRUCTURE 2.3.3 (Pritchard *et al.*, 2000). Analyses were based on the admixture model with correlated allele frequencies with simulations of 10^5 burn-in steps and 10^6 iterations of MCMC algorithm for each run. Ten runs for each K (number of genetic clusters) value [1-20] were computed to estimate the most likely value of K. Optimal number of clusters was determined using Evanno's estimator ΔK (Evanno *et al.*, 2005) implemented in STRUCTURE HARVESTER (Earl and vonHoldt, 2011). Principal Components Analysis (PCA) was used to visually identify and describe clusters of genetically related individuals with *adegenet* 1.3 - 9.2 package (Jombart, 2008).

2.4. Testing for a bottleneck event using ABC

Approximate Bayesian Computation (ABC) using DIYABC software version 2.0 was performed on microsatellite data to test for potential bottleneck events (Cornuet *et al.*, 2008, Cornuet *et al.*, 2010). This method ranks scenarios based on their approximate posterior probabilities. For each scenario, a large number of simulated data sets are produced by sampling parameter values into prior distributions (Table III-1). The occurrence of each scenario among the simulated data sets that are closest to the observed data gives an estimate of its posterior probability using a logistic regression procedure. Four demographic scenarios were compared here (Figure III-2), two with a bottleneck and two without.

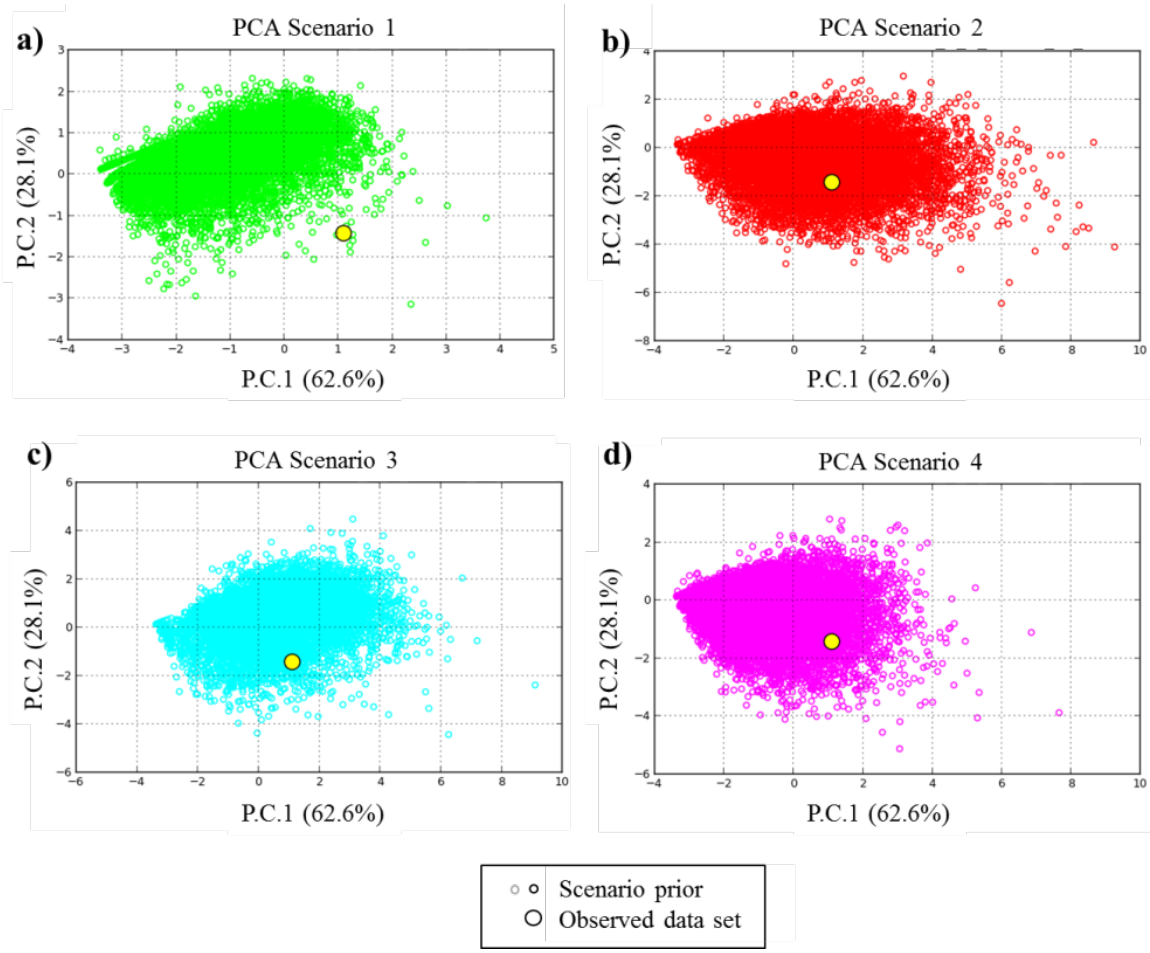
In scenario 1, the Rodrigues population is assumed to have an effective number of individuals N_1 that has been constant over time, including at colonization. In scenario 2, an effective number of queens N_b sampled from an ancestral population of effective size N_{anc}, founded the Rodrigues population t generations ago. This bottleneck lasted d_b generations. After that, the effective population size increased to the current population size N_1. It is reasonable to assume that the Rodrigues population was not founded from a single population source, but rather by several successive introductions from distinct origins. Such admixed origin may leave important signatures in the genetic structure of the population and should therefore be accounted for (Estoup and Guillemaud, 2010).

Scenarios 1 and 2 were complemented with two others accounting for the admixture at the origin of the Rodrigues population. In scenario 3, the current population resulted from the admixture of two ancestral and unsampled populations of sizes N_2 and N_3 respectively (same evolutionary lineage or not) at a time t_a and with admixture rate r_a. These two ancestral populations were assumed to have diverged from a common ancestor at date t_1. Scenario 4 is the same, except that during the admixture the population suffered a bottleneck. The details on the method used for DIYABC estimations are given in figure III-S1.

Description of the method used and preliminary results for DIYABC analyses:

1) Simulations and prior checking:

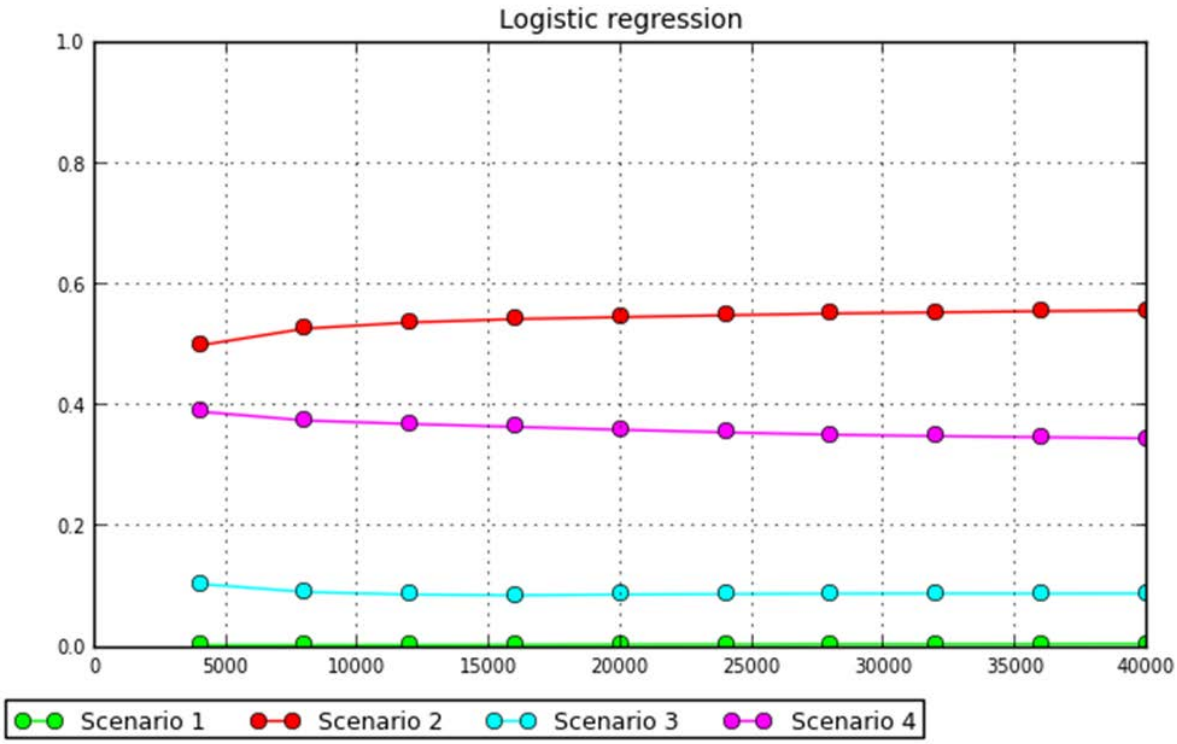
As recommended by Cornuet et al. (2008, 2010), we performed one million simulations of data sets per scenario with DIYABC software. Demographic parameters were sampled into prior distributions (typically uniform distributions, see Table III-1 in the article for the full prior description). Mutations were assumed to follow a Generalized Stepwise Mutation model with rare insertions/deletions in flanking regions. All genetic parameters prior were the program default values. Then, prior checking was conducted using PCA over 10 000 random simulations. This was done in order to check that the chosen prior distributions allowed simulating data sets to be close to the observed data whatever the scenario envisaged. The results of this preliminary analysis are presented below with the PCA for all four scenarios used (Fig III-2).



2) Posterior probability for each scenario and confidence choice:

The posterior probability of each scenario was calculated and compared with others by performing a weighted logistic regression on 1% of simulated data sets closest to observed data set (Cornuet *et al.*, 2010, Cornuet *et al.*, 2008).

The logistic regression obtained for posterior probabilities for all four scenarios are presented below (number of simulations in abscissa and posterior probability in ordinate):



Thereafter, the confidence in scenario choice was calculated by evaluating Type I and II error rates, following method described in Cornuet et al. (2010). We first produced 500 simulated data sets (later called, pseudo-observed data sets or PODs) for each scenario and analyzed each of them as the true data, by computing their posterior probability. Type I error was estimated by counting the proportion of PODs simulated under the best scenario X (given scenario) for which X did not have the highest posterior probability. Type II error was estimated by the proportion of PODs that resulted in highest posterior probability of the best scenario, although simulated with other scenarios. Results of the test for confidence are presented in Table S2.

3) Estimations of the scenario demographic parameters:

For the most likely scenario, one million data sets were simulated independently of previous simulations to obtain parameter estimates, using the mode of posterior distribution as a point estimate. Precision of parameter estimation was assessed by computing the relative bias and the relative root mean square error on 500 PODs simulated with the best scenario.

Figure III-S1 : Box with description of the method used for DIYABC software with preliminary PCA of 10 000 simulated data sets for each scenario and logistic regression of posterior probabilities per scenario.

3. Results

3.1. Mitochondrial DNA

PCR amplifications of the mtDNA intergenic COI-COII region were successful for 468 out of the 524 individuals sampled. All amplified products presented the same size ~ 570 bp, which corresponds to the length of Q type sequence, characteristic of the East European C lineage (Garnery *et al.*, 1998a). After PCR-RFLP analyses were performed, only one restriction fragment pattern was observed (fragment size ~40/41, 47, 64 and 420pb).

Of the 278 individuals sequenced (Figure III-1), three different sequences were detected. Two were previously described as the C1(a) haplotype belonging to populations of the *Apis mellifera ligustica* subspecies (GenBank accession FJ478010.1, (Franck *et al.* 2001); JQ977699.1, (Muñoz *et al.*, 2012b); EF033655.1, (Collet *et al.*, 2006)) and the C2(j) haplotype reported in *Apis mellifera carnica* (JF723978.1). The third sequence exhibited 99% similarity with C1, and presented a new polymorphic site. This new sequence was named C1-Rod (KF955993). C1 was the most frequent (*n* = 226, 81.3%, KF955992) and was present in all sites, C2 (KF955994) was observed in 50 colonies from 11 sites (18.0%), while C1-Rod was only detected in two colonies (0.7%) of the same site S15 (Figure III-1).

3.2. Microsatellite loci

A107 and AP81 i) were difficult to score, ii) presented high levels of null alleles (13.2% and 9.2%, respectively) and iii) had the highest levels of missing data (3.8 and 1.5% respectively). For these reasons, A107 and AP81 were removed from nuclear analysis. All individuals were successfully genotyped with at least 10 *loci* amplified. Only nine *loci* combinations of 120 were significantly linked and involved different *loci*.

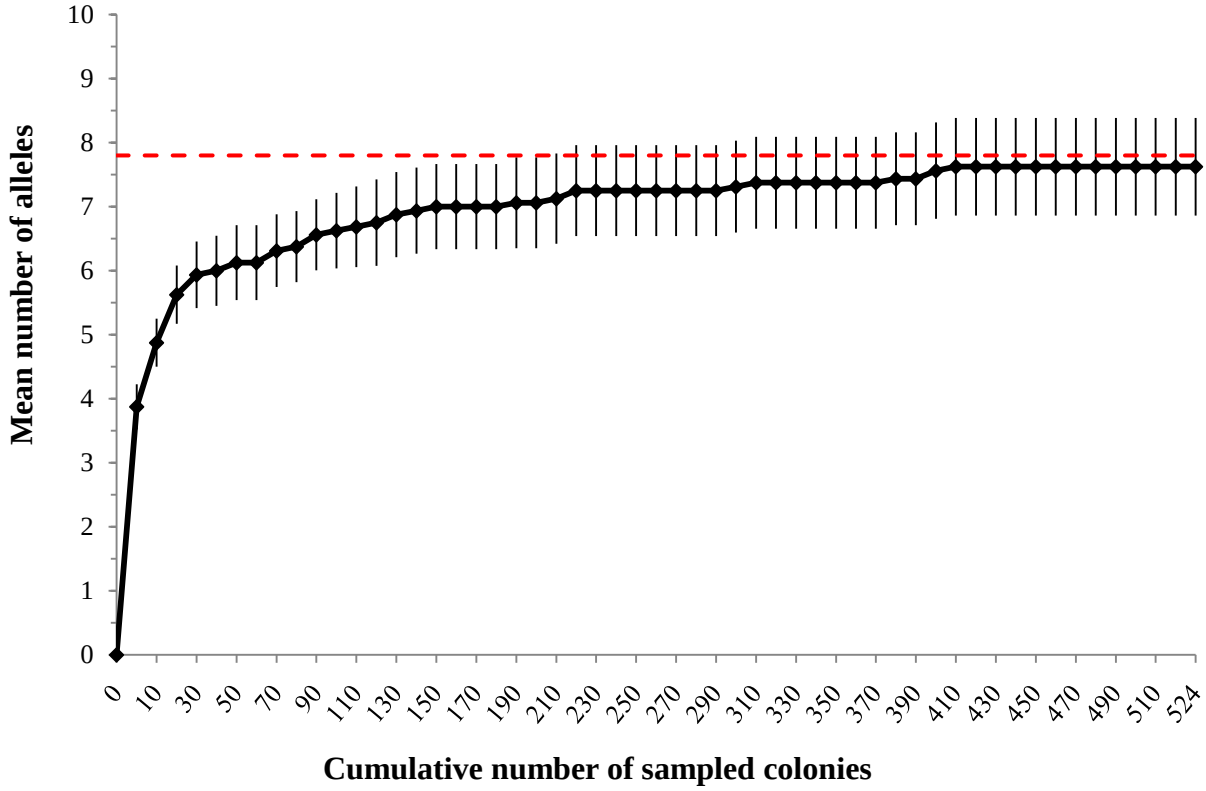


Figure III-S2 : Sampling effort represented by the cumulative number of colonies sampled (ordered by sampling date) and mean number of alleles per *locus* (± Standard deviations). The red dotted line represented the asymptote with x = 7.80.

The number of detected alleles per *locus* ranged from three (AP273) to 15 (A029) for all individuals (n = 524) (Table III-S1). Over all the sites, the mean number of alleles (n = 16 *loci*) detected was 7.63 (± 3.05). Genetic diversity between sites was comparable when sample size was corrected with an allelic richness ranging from 4.75 (± 1.58) for S13 to 5.09 (± 1.38) for S8. An asymptotic relationship was observed between the mean number of alleles and the cumulative number of sampled colonies (Figure III-S2). According to Pons and Chaouche (1995), the genetic diversity of the sample (representing 23.3 % of the colonies identified in 2010, (Belmin, 2010)) was considered representative of the global genetic diversity of the Rodrigues honeybee population (Figure III-S2). Overall observed heterozygosity was similar to what was predicted under the HWE model (Table III-2). Multilocus values of F_{IS} per site ranged from -0.075 (B1-b) to 0.051 (B6) and overall value was -0.001 (Table III-2). After FDR correction, none of these F_{IS} values were significant and all sites were assumed to be under the HWE.

Genetic differentiation between sites (pairwise F_{ST}) was low and ranged from -0.009 (sites S17 and S16) to 0.022 (sites S3 and S6). After Bonferroni corrections, only one pair of 153 pairwise comparisons was significant, (F_{ST} = 0.014; p-value = 0.000260 < p-value adjusted for multiple comparisons = 0.000263) for sites S15 and S12, respectively.

Analyses of Bayesian model-based clustering with STRUCTURE did not reveal evidence of population structure and differentiation, using the method of Evanno et al. (2005) (Figure III-S3). When K was > 1, the probability of posterior assignment of each individual was equivalent for each cluster. Those results were supported by complementary PCA analyses which did not show any differentiation between groups of individuals.

3.3. Testing for a bottleneck event using ABC

Scenarios were ranked according to their posterior probabilities as follows: the best scenario was scenario 2 with a posterior probability of 0.558 (95% confidence interval [0.543, 0.571]). Then, scenario 4 (p = 0.347 [0.333, 0.361]), followed by scenario 3 (P = 0.089 [0.080, 0.099]).

Table III-2 : Sampling information with site code, number of colonies ($N_{colonies}$); mean number of alleles (N_a); observed heterozygosity (H_{obs}); expected unbiased heterozygosity (H_{exp}); Weir & Cockerham's (1984) fixation index (F_{IS}). Standard deviation is indicated in parentheses.

Site	$N_{colonies}$	N_a	Ar	H_{obs}	H_{exp}	F_{IS}
S1	19	5.63 (± 1.71)	4.89 (± 1.25)	0.701 (± 0.167)	0.673 (± 0.122)	-0.043
S2	42	6.19 (± 2.07)	4.87 (± 1.32)	0.664 (± 0.144)	0.641 (± 0.146)	-0.036
S3	17	5.06 (± 1.65)	4.81 (± 1.11)	0.643 (± 0.214)	0.614 (± 0.203)	-0.049
S4	2	-	-	-	-	-
S5	22	5.75 (± 1.81)	5.01 (± 1.58)	0.640 (± 0.204)	0.637 (± 0.173)	-0.004
S6	12	4.81 (± 1.11)	4.87 (± 1.20)	0.693 (± 0.210)	0.648 (± 0.158)	-0.073
S7	20	5.38 (± 1.67)	4.95 (± 1.37)	0.653 (± 0.195)	0.617 (± 0.170)	-0.061
S8	12	4.94 (± 1.44)	5.09 (± 1.38)	0.677 (± 0.221)	0.632 (± 0.196)	-0.075
S9	32	5.81 (± 1.60)	4.94 (± 1.44)	0.660 (± 0.168)	0.641 (± 0.152)	-0.031
S10	19	5.44 (± 1.50)	4.94 (± 1.32)	0.633 (± 0.172)	0.643 (± 0.147)	0.016
S11	19	5.56 (± 1.90)	5.07 (± 1.53)	0.625 (± 0.150)	0.640 (± 0.164)	0.023
S12	17	5.31 (± 1.66)	4.89 (± 1.38)	0.614 (± 0.168)	0.626 (± 0.146)	0.020
S13	27	5.75 (± 1.69)	4.75 (± 1.58)	0.632 (± 0.187)	0.640 (± 0.187)	0.013
S14	35	6.13 (± 1.93)	4.89 (± 1.33)	0.663 (± 0.154)	0.656 (± 0.129)	-0.010
S15	49	6.25 (± 2.57)	5.04 (± 1.47)	0.626 (± 0.180)	0.630 (± 0.166)	0.007
S16	64	6.31 (± 2.02)	4.82 (± 1.55)	0.628 (± 0.146)	0.645 (± 0.139)	0.027
S17	16	5.31 (± 1.70)	5.01 (± 1.48)	0.642 (± 0.111)	0.676 (± 0.119)	0.051
S18	52	6.56 (± 2.16)	4.99 (± 1.29)	0.633 (± 0.161)	0.650 (± 0.157)	0.025
S19	7	-	-	-	-	-
S20	41	6.25 (± 1.98)	5.01 (± 1.32)	0.624 (± 0.172)	0.612 (± 0.157)	-0.021
	524	7.63 (± 3.05)		0.644 (± 0.143)	0.643 (± 0.144)	-0.001

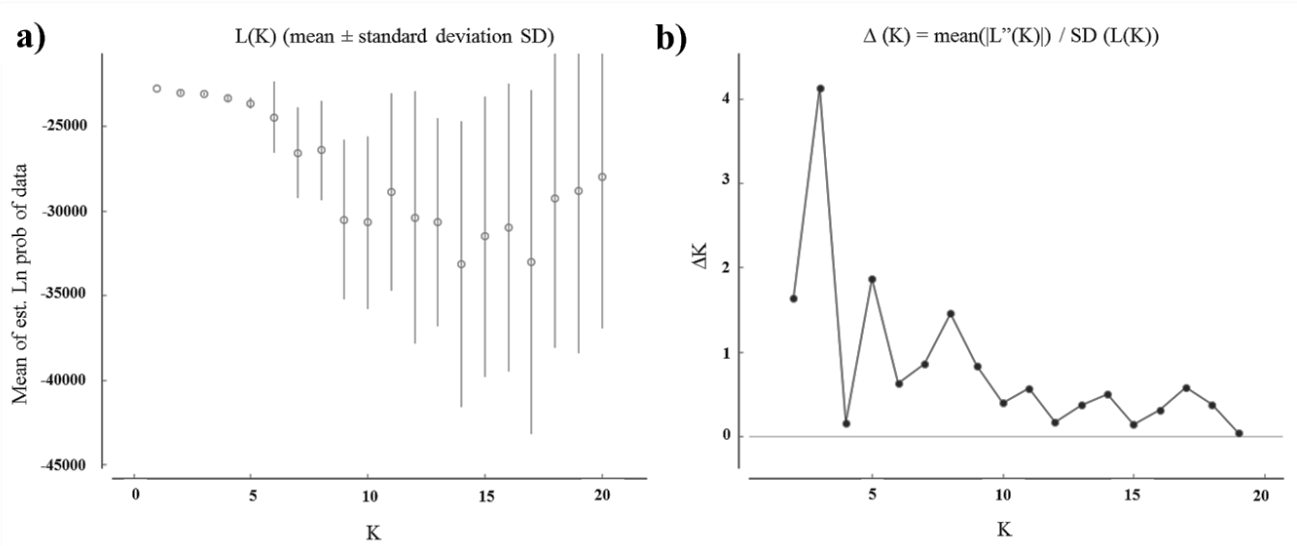


Figure III-S3 : a) Average likelihood of runs in STRUCTURE (Pritchard *et al.*, 2000) L(K) along with number of K clusters, b) ΔK, estimator of the optimal number of clusters (K) according to Evanno et al. (2005).

The last was scenario 1 (P = 0.006 [0.000, 0.014]). Based on posterior probabilities, scenarios implicating a bottleneck (2 and 4) were more probable (a total posterior probability of 0.904) and supplanted the scenarios without a bottleneck (1 and 3, for a total posterior probability of 0.096). Full results of simulations to test for scenario confidence are given in Table III-S2. The probability that data sets simulated under scenarios without bottleneck (1 or 3) were assigned to the scenarios with bottleneck (2 or 4) amounted to 0.101 (type II error rate).

Parameter estimates, relative bias and relative precision indices for scenario 2 are listed in table III-1. Genetic parameters and ancestral population size N_{anc} could not be estimated with precision (data not shown). Despite this, it is remarkable that noteworthy parameters could be estimated with satisfactory precision. The current population effective size N_1 was estimated at around 760 individuals (95% confidence interval [333 – 1840]). The population experienced a bottleneck event 49 generations ago, ending 19 [7 – 95] generations ago and lasting approximately 30 [9 – 47] generations.

Estimations suggested that around 60 [20 – 95] individuals colonized or were introduced to the island from a larger and ancestral population with an effective size of over 7463 [5470 - 9840].

4. Discussion

Mitochondrial analyses showed that all sampled colonies had only the Q sequence characteristic of the C lineage. This result is startling knowing that the honeybees of the surrounding islands are of African lineage (Ruttner, 1988, Franck *et al.*, 2001). Furthermore, Rodrigues mainly depends on Mauritius for commercial exchanges; honeybees could have easily colonized Rodrigues. European queens introduced in 1981 could have been more competitive and/or more favored by the beekeepers than the African lineage (if present).

The sequencing of the COI-COII intergenic indicated *A. m. ligustica* (C1, C1-Rod) and *A. m. carnica* (C2) descendants (Garnery *et al.*, 1993, Garnery *et al.*, 1998a). *A. m. ligustica* maternal lineages were four times more prevalent than *A. m. carnica* over

all the sampling. Presence of European C lineage haplotypes is consistent with the reported introduction of queens bought from United States commercial stock (Bappoo and Ramanah, 1989). In the USA, haplotypes C1 and C2 are characteristic of the most popular honeybee strains sold (Delaney *et al.*, 2009). These commercially widespread subspecies have adapted well to the environmental conditions of this tropical island and persisted for over 32 years.

Furthermore, results of the ABC scenario choice support the assumption that the introduction of honeybees to the island was associated with a genetic bottleneck. Results from the bottleneck test are entirely credible in such insular ocean environments where colonization is limited by geographical barriers. According to the best scenario (2 with P = 0.558) this bottleneck event occurred approximately 49 generations ago (in an interval of 16 to 142 generations). One generation of *A. mellifera* is assumed to be approximately two years (Estoup *et al.*, 1995a, Excoffier *et al.*, 2005). Present estimations are consistent with historical records of introductions of European honeybees in 1981. DIYABC results also suggest that the origin population had a large effective size (more than 7463 individuals). In the USA, the honeybee population was estimated to be 4.5 million colonies in 1980 (vanEngelsdorp *et al.*, 2008).

Nuclear genetic analyses indicated that the honeybee colonies on Rodrigues constituted one genetic population with homogenous diversity among sites. This observation was also demonstrated in other oceanic islands such as Menorca (701.8 km²) and Ibiza (572 km²) (De la Rúa *et al.*, 2003). No genetic differentiation appeared along geographical distances indicating that gene flow is sufficient to homogenize nuclear genetic diversity. Rodrigues is a small island (104 km²) where apiary transhumance is not practiced by beekeepers. The distance between sedentary colonies might be too small to create genetic isolation (0.60 to 13.8 km). Exchange of queens between beekeepers, colony swarming and male flight most likely ensure gene flow. Here, no nuclear genetic differences were found between colonies with the mtDNA sequence characteristics of *A. m. ligustica* and *A. m. carnica* whereas Muñoz *et al.* (2009) were able to detect differences between subspecies. This absence of genetic difference suggests that either hybrids were introduced or hybridization occurred after introduction. The study gives evidence of anthropogenic effects on the

honeybee population in Rodrigues such as i) the presence of exotic subspecies favored by beekeepers, ii) hybridization phenomena between subspecies and iii) absence and/or non-utilization of the A lineage honey bees present in the area.

The Rodrigues honeybee population has levels of genetic diversity comparable to continental European populations of *A. m. ligustica* and *carnica*. For four comparable *loci* (A113, Ap55, B124 and Ap43), indigenous populations of *A. m. carnica* and/or *ligustica* in Croatia and Italy showed between 9.25 to 9.75 alleles per *locus* whereas 8.50 alleles were detected in the Rodrigues population (Muñoz *et al.*, 2009). Another indication of the high levels of genetic diversity was heterozygosity (H_{obs}= 0.644) which was equivalent to i) indigenous Italian and Croatian populations (H_{obs} = 0.638 and H_{obs}= 0.674, respectively (Muñoz *et al.*, 2009)) and ii) US commercial populations (H_{obs}= 0.53 in 2005 (Delaney *et al.*, 2009)).

Levels of heterozygosity of the Rodrigues honeybee population were higher than other insular systems in which *A. m. ligustica* was introduced. As an example, in the Azores, 35% of colonies had haplotype C1 (cohabiting with 48% of sub-lineage A_{III} and 17% A_{II}) and levels of observed heterozygosity were two times lower (H_{obs}= 0.22 ± 0.03) than in Rodrigues (De la Rúa *et al.*, 2006). The same can be found in the Canary Islands, with only 31.2% of observed heterozygotes in El Hierro (n = 17, 18% of haplotype C1 and 82% haplotype A15) and 41.3% in Tenerife (n = 76, 35% of C1 and three other African haplotypes) (De la Rúa *et al.*, 2001a). Unlike the rest of the world, the honeybee population in Rodrigues did not experience strong biological pressure caused by parasites and pathogens and this could explain these differences (vanEngelsdorp and Meixner, 2010). *A. mellifera* in Rodrigues Island has a remarkable sanitary situation with no *Varroa destructor* (Belmin, 2010), which was recently reported in Madagascar (Rasolofoarivao *et al.*, 2013). To this day, the only known parasites and pathogens are the bee louse *Braula pretoriensis* and *Nosema apis* (Rehm, 1988).

This study revealed a surprising lack of African lineage and exclusive presence of two subspecies: *A. m. carnica* and *A. m. ligustica* from the European C lineage. The honeybee population in Rodrigues did not show genetic structure but presented high levels of heterozygosity.

5. Acknowledgements

We would like to thank J. Félicité, G. Volbert and the Commission of Apiculture and Agriculture of Rodrigues for their welcoming and assistance in organizing the collection of samples. We are also grateful to the beekeepers: J.J. Clain, J.N. Daya, L. Felicité, D. François, G. François, J. Herman-Casimir, J.P. Kan-John, J.H. Marianne, C. & M. Peermamode, M.J. Ravanne, J. Rikarl, and the feminine associations Ile Michel and Rodrigues-Farmer. We wish to thank C. Simiand for his assistance in the laboratory. We would like to warmly thank V. Ravigné for her precious help with DIYABC software, for the understanding of the methods, the analyses and results and for her corrections. We thank L. Garnery for his advice on molecular methodology. We would like to thank the anonymous reviewers for improving the manuscript. Finally we thank the network QualiREG and V. Porphyre for helpful contacts. M. A. Techer is recipient of a PhD fellowship of the Sciences and Technology Doctoral School of the University of La Réunion. This study was partially funded by CIRAD, Région Réunion and e-PRPV.

Colonie d'abeille exploitée de manière traditionnelle sur l'île de Mahé

IV) Chapitre 3 : Diversité génétique des populations d'abeille (*Apis mellifera* L.) de l'archipel des Seychelles§§

Maéva Angélique Techer, Johanna Clémencet, Christophe Simiand, Gilbert Portlouis, Bernard Reynaud, Delatte Hélène

Résumé

1) Dans la région du Sud-Ouest de l'océan Indien, l'abeille *Apis mellifera* est retrouvée sur plusieurs îles dont celles de l'archipel des Seychelles. Cet archipel est situé à 1 120 km au Nord de Madagascar, où la sous-espèce endémique *A. m. unicolor* a été référencée. La diversité génétique des populations insulaires d'abeilles établies aux Seychelles n'a jamais fait l'objet d'étude, pourtant cette espèce interagit avec une flore indigène et présentant de forts taux d'endémisme.

2) Un total de 186 colonies d'abeilles ont été échantillonnés sur les trois îles principales de l'archipel : Mahé, Praslin et La Digue. En plus de ces colonies, 107 individus provenant de Madagascar (*A. m. unicolor*) et 49 individus d'Italie (*A. m. ligustica*) ont été analysés comme potentielles populations sources. La détermination des lignées évolutives et sous-lignées a été réalisée à partir de la PCR-RFLP *DraI* (n = 342) et du séquençage de la région intergénique COI-COII de l'ADN mitochondrial. La diversité et la structure génétique nucléaire à l'échelle intra-archipel et intra-île a été analysée à partir de 15 microsatellites. A l'échelle inter-populations (îles et continents), la comparaison de la variabilité nucléaire a été effectuée avec 14 microsatellites.

§§ **Ce chapitre a fait l'objet d'une publication dans la revue *Insect Conservation and Diversity* en 2015** (facteur d'impact 2,174).

3) Toutes les colonies analysées des Seychelles présentaient des séquences COI-COII caractéristiques de la lignée évolutive africaine. Au sein de celle-ci, deux sous-lignées ont été détectées : i) la sous-lignée A_I (haplotype de type A1) majoritaire à 96,7% sur l'ensemble des îles de l'archipel indiquant la présence d'*A. m. unicolor* et ii) la sous-lignée Z uniquement retrouvée à Praslin et La Digue. Aucune trace des lignées évolutives européennes importées par le passé n'a été retrouvée à l'aide du marqueur mitochondrial COI-COII.

4) Les niveaux de diversité génétique nucléaire étaient élevés et structurés, suggérant une réduction de flux de gènes entre les îles de l'archipel. La diversité nucléaire des populations d'abeilles des Seychelles était très proche des populations malgaches d'*A. m. unicolor*. Néanmoins une différenciation génétique nucléaire significative a été observée i) entre les îles de l'archipel des Seychelles, i) entre les Seychelles et Madagascar, et iii) à un fort degré entre l''archipels et les populations européennes continentales d'*A. m. ligustica*.

Mots clés : archipel des Seychelles, abeille, COI-COII, ADNmt, microsatellites, *Apis mellifera unicolor*, sous-lignée Z, île, tropical

Genetic diversity of the honeybee (*Apis mellifera* L.) populations in the Seychelles archipelago

Maéva Angélique Techer[1,2], Johanna Clémencet[1], Christophe Simiand[2], Gilbert Portlouis[3], Bernard Reynaud[2], Delatte Hélène[2]

[1] Université de La Réunion, UMR PVBMT, F-97715 Saint Denis cedex 9, La Réunion, France

[2] CIRAD, UMR PVBMT, 7 chemin de l'Irat, Ligne Paradis, 97410 Saint Pierre, La Réunion, France

[3] Seychelles Agricultural Agency, PO Box 166, Ministry of Natural Resources, Investment & Industry, Victoria, Mahé, Seychelles

Abstract

1) In the South West Indian Ocean, the honeybee *Apis mellifera* is found on several islands including the Seychelles archipelago. This archipelago is located 1120 km North of Madagascar where the endemic African subspecies *A. m. unicolor* occurs. The genetic diversity of the honeybee populations in the Seychelles islands has never been studied, yet this species interacts with a highly endemic and indigenous flora.

2) A total of 186 honeybee colonies from the three main islands: Mahé, Praslin and La Digue were collected. In addition, 107 individuals from Madagascar (*A. m. unicolor*) and 49 from Italy (*A. m. ligustica*) were analysed as reference populations. The maternal lineages were assessed using PCR-RFLP (n = 342) and sequencing (n = 121) of the mtDNA COI-COII intergenic region. Intra-Seychelles nuclear genetic diversity and structure were analysed using 15 microsatellites while comparison with reference populations was done using 14 *loci*.

3) All Seychellian colonies had mtDNA sequences characteristic of the African evolutionary lineage. Two sub-lineages were detected: A_I sub-lineage (A1) was dominant (96.7%) on all islands and mostly represented by the subspecies *A. m. unicolor,* while Z sub-lineage was observed in six colonies from two islands. No mtDNA characteristic of imported European lineages was detected.

4) Nuclear genetic diversity was high and structured, suggesting restricted gene flow between islands of the archipelago. High nuclear similarities were found among the Seychellian and *A. m. unicolor* populations, yet significant genetic differentiation was observed. *A. m. ligustica* reference population was highly differentiated from the Seychellian honeybee populations.

Key words: Seychelles archipelago, honeybee, COI-COII, mtDNA, microsatellites, *Apis mellifera unicolor*, Z sub-lineage, island, tropical

1. Introduction

The native range of the honeybee, *Apis mellifera*, includes Europe, Middle East, Africa and many surrounding islands. Its biodiversity has been assessed using various tools from the morphometric approach (Ruttner, 1988) to numerous genetic markers (Whitfield *et al.*, 2006, Meixner *et al.*, 2013, Wallberg *et al.*, 2014). The wide geographical range, ecological plasticity and last glaciations led to the divergence of *A. mellifera* populations into four or five evolutionary lineages: African "A" including a "Z" genetic sub-lineage (Alburaki *et al.*, 2011, Alburaki *et al.*, 2013), Europeans "M" (West Mediterranean) and "C" and (North Mediterranean), Oriental "O" and Yemenite "Y" (Garnery *et al.*, 1992, Franck *et al.*, 2000b, Whitfield *et al.*, 2006, Ruttner, 1988, Wallberg *et al.*, 2014). Among the 30 recognized subspecies, 10 belong to the African lineage (Ruttner, 1988, Hepburn and Radloff, 1998, Engel, 1999, Meixner *et al.*, 2011, Sheppard and Meixner, 2003). One of them, *Apis mellifera unicolor* has been described endemic to Madagascar (Ruttner, 1988, Latreille, 1804). Recent genetic analysis based on several mtDNA and nuclear markers revealed that *A. m. unicolor* was genetically distinguishable from other African subspecies (Rasolofoarivao *et al.*, 2015, Han *et al.*, 2012, Whitfield *et al.*, 2006).

In the South West Indian Ocean (SWIO), the honeybee is also established in islands surrounding Madagascar, such as the Mascarene, the Comoros and the Seychelles archipelagos (Crane, 1999). These islands exhibit high levels of endemism and have been defined as one the 34 "hotspots" of biodiversity, in which Madagascar constitutes the heart (Myers *et al.*, 2000, Mittermeier *et al.*, 2011). Among them, the Seychelles archipelago is composed of 115 islands of different size from less than 0.1 to 156 km². First colons settled durably on Mahé in 1770 and later on Praslin, La Digue and Silhouette (Lionnet, 1984, Fauvel, 1909, Cheke, 2010). The presence of *A. mellifera* before human arrival in the archipelago is unclear. Historical records contradict each other and the naturalistic expertise of authors is hard to define. One of them reported presence of "honeybees" before settlement in 1768 (Marion Dufresne expedition (Lionnet, 1984)) while another clearly stated the absence of "yellow wasps, and honeybees" later in 1787 (Fauvel, 1909). Besides confusion is added by a contemporary review that suggests that the first report actually described

a native solitary bee (*Megachile*) rather than *A. mellifera* (Cheke, 2010). Similarly, knowledge is fuzzy concerning the date of first introduction of honeybees into the Seychelles. Importations of honeybees have never been mentioned in colonial memoirs (1770-1810) in which all exchanges were scrupulously reported (Fauvel, 1909). Yet speculations about the introduction of *A. m. unicolor* from Madagascar during the colonial period (as in other SWIO colonies), exist in many reports (Crane, 1999, FAO, 1990).

First records of beekeeping activities date back to the 1910s and involved the local "black bee" supposed to be *A. m. unicolor* (Seychelles Departement of Agriculture, 1918). At the same period, the first honeybee identification based on morphology (1907) described *A. m. unicolor* (with possible traces of *A. m. adansonii*), and its presence in several islands including Mahé (Cockerell, 1912). Occasional referenced importations of the supposed more productive "Italian honeybee" were done from Italy (1918), United Kingdom (1949) and Australia (1989) (FAO, 1990, Seychelles Departement of Agriculture, 1918, Seychelles Departement of Agriculture, 1949). All these importations were done on Mahé first and some of them extended to other islands. Based on coloration pattern, presence of hybrids offspring between Italian "yellow honeybee" and

the local "black bee" was observed (Silberrad, 1970, FAO, 1990, Tealdi, 1990). However, based on morphometric observations, Ruttner (1993) did not detect evidence of European subspecies but rather a honeybee close to *A. m. unicolor* from Madagascar.

Nowadays, honeybee is known to be present in Mahé, Praslin, La Digue, Cousine and was noticed in Marianne, D'Arros Island, Frégate, Silhouette, North Island and Coetivy (Hussein, 2001, FAO, 1990, Samways *et al.*, 2010). Since late 1990s, a quarantine protocol exists in the Seychelles archipelago and honeybee introduction has been restricted to avoid parasites and pathogens introduction (Seychelles Veterinary Services, personal communication). Honey production can be done all year round thanks to the tropical climate and the constant abundance of resources (*Albizia falcataria, Cocos nucifera, Scaevola taccada, Calophyllum inophyllum, Pterocarpus*

indica) (FAO, 1990). Beekeeping practices rely mostly on trapping swarms and collecting feral colonies, and transhumance is not practiced.

As a consequence of XXth century importations, *A. mellifera* in the Seychelles archipelago has been considered as an "introduced honeybee" (Blackmore *et al.*, 2012, Kaiser-Bunbury *et al.*, 2011). Yet, this designation relies essentially on historical records of a contemporary colonization of the archipelago. Up to now no molecular data exist on the Seychellian honeybee populations. In order to assess the diversity of these populations, we characterized for the first time the honeybee in the Seychelles archipelago (Mahé, Praslin and La Digue) by using mitochondrial and nuclear genetic markers. Then, we compared the genetic diversity of the Seychellian honeybees to potential populations of origin such as the African subspecies *A. m. unicolor* from Madagascar and the European subspecies *A. m. ligustica* from Italy.

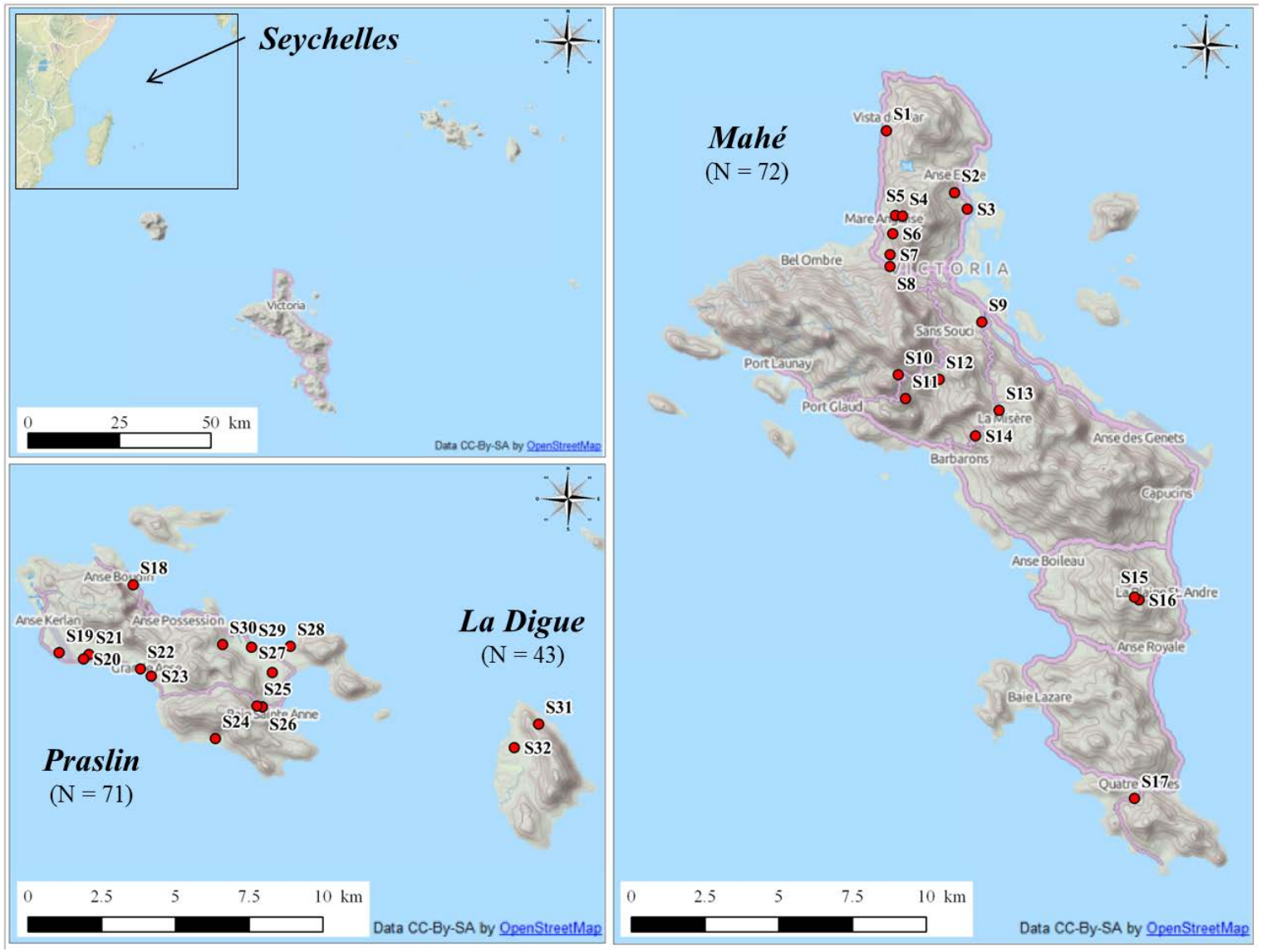


Figure IV-1 : Distribution of the 32 honeybee colonies sampling sites in the three main and targeted islands of the Seychelles archipelago: Mahé, Praslin and La Digue.

2. Materials and Methods

2.1. Honeybee colonies sampling

In January 2013, a total of 186 honeybee colonies were sampled from 32 sites on the three main islands of the Seychelles archipelago: 72 on Mahé (156 km²), 71 in Praslin (38 km²) and 43 in La Digue (10 km²) (Figure IV-1). Islands are separated by 53 km (Mahé – La Digue) to 11 km (Praslin – La Digue) (Figure IV-1). All colonies identified by the Seychelles Agricultural Agency and encountered during field prospections were systematically sampled. Ten wild and 176 managed colonies were sampled from 15 beekeepers (Table IV-1). Two honeybee workers were collected at the entrance of each colony. The honeybees were immediately killed by immersion in 95% ethanol and stored at – 20°C until molecular analysis.

Two reference populations from African and European lineages were included in the study: 107 individuals from the endemic subspecies *A. m. unicolor* population in Madagascar (9 sites: S02, S15, S22, S28, S35, S62, S65, S66, S72; cf. Figure 1 from Rasolofoarivao *et al.* (2015)) and 49 individuals from *A. m. ligustica* native population in Italy (three locations: Lombardy, Emilia-Romagna and Campania from the collection of P. Franck, INRA Avignon).

2.2. DNA extraction and mitochondrial analysis

For each sampled colony, one honeybee was analysed using both mitochondrial and nuclear markers. Total DNA from Seychellian samples was extracted from the six legs following the Garnery et al. (1993) method with minor modifications. Reference Malagasy samples had followed the same DNA extraction and analyses conditions, so mtDNA and microsatellites data were directly extracted from the dataset of Rasolofoarivao *et al.* (2015). In order to have comparable data for Italian samples, total DNA was extracted from one leg and followed the same laboratory protocol than Seychellian and Malagasy individuals.

Table IV-1 : Sampling details with island location, site code, type of colony (wild or managed), beekeeper and apiary origin, location name and number of colony sampled (N_{colony}).

Island	Site	Type	Beekeeper - Apiary	Location	N_{colony}
Mahé	S1	Managed	B1	Sunset Beach	6
	S2	Managed	B2	Ma Constance	5
	S3	Managed	B3	Quincy Village	7
	S4	Wild	-	La Batie	1
	S5	Wild	-	La Batie	1
	S6	Wild	-	Beau Vallon, Panorama	1
	S7	Managed	B4	Beau Vallon, Pascal Village	2
	S8	Managed	B5	Beau Vallon, Pascal Village	13
	S9	Managed	B6	Plaisance	7
	S10	Wild	-	National Park - Cassedent	1
	S11	Wild	-	National Park - Montagne Noire	1
	S12	Wild	-	National Park - Salazie	1
	S13	Managed	B7	La Misère	10
	S14	Managed	B8	La Misère	7
	S15	Managed	B9	Pointe au sel	1
	S16	Managed	B9	Pointe au sel	2
	S17	Managed	B10	Takamaka	6
Praslin	S18	Managed	B11 - a	Anse Boudin	17
	S19	Wild	-	Amité	1
	S20	Wild	-	Amitié (Seychelles Agricultural Agency)	1
	S21	Managed	B12 - a	Grande Anse	2
	S22	Wild	-	Grande Anse	1
	S23	Managed	B12 - b	Grande Anse	6
	S24	Managed	B11 - b	Saint Sauveur	1
	S25	Wild	-	Baie Sainte Anne	1
	S26	Managed	B11 - c	Baie Sainte Anne	3
	S27	Managed	B13	Cap Samy	2
	S28	Managed	B11 - d	Côte d'or	1
	S29	Managed	B11 - e	Côte d'or	34
	S30	Managed	B11 - f	Salazie	1
La Digue	S31	Managed	B14	Anse Gaulettes	38
	S32	Managed	B15	La Passe	5
					186

Mitochondrial analysis consisted of PCR-RFLP (*DraI* test) and sequencing of the intergenic COI-COII region (Garnery *et al.*, 1993). The COI-COII region was amplified using the primers E2 and H2 (Garnery *et al.*, 1992) as described in Garnery et al. (1993). Then PCR products were digested with the *DraI* enzyme, and restriction reactions were performed in 10µL according manufacturer recommendation (*Promega*). Restriction fragments were run on 4% agarose gel and revealed with ethidium bromide. To assess sequence diversity in the Seychelles archipelago, all different restriction profiles observed and, a minimum of 30% of samples randomly selected per site were amplified (E2/H2 primers) and sent for sequencing to Macrogen©. Sequences were manually checked and aligned using Mega 5.1 software (Tamura *et al.*, 2011). All mitochondrial sequences were blasted on NCBI GenBank and newly described ones were submitted to the database.

2.3. Microsatellite genotyping

All samples were genotyped at 17 polymorphic microsatellite *loci* in four multiplex PCRs: A113, A24, AC306, AP55, A88, A107, A28, A29, AP289, AP273, (A)B124, A8, A35, AP33, AP66, AP43 and A43 (Estoup *et al.*, 1994, Estoup *et al.*, 1995a, Franck *et al.*, 1998, Solignac *et al.*, 2003) (Table IV-S1). PCR reactions and genotypes scoring followed the same method as described in Techer *et al.* (2015b).

2.4. Nuclear population genetic and structure analysis

MICRO-CHECKER 2.2.3 (Van Oosterhout *et al.*, 2004b) was used to identify genotyping errors. Then, null allele frequency per *locus* was estimated in overall samples with FREENA (Chapuis and Estoup, 2007). Linkage disequilibrium between all pairs of *locus* was tested using GENEPOP 3.4 (Raymond and Rousset, 2004). Individuals with less than 60% of genotyping success were removed from the analyses. Population genetic analyses were conducted considering sites, islands and archipelago levels. Mean number of alleles (*Na*), observed (H_{obs}) and unbiased expected heterozygosity (H_{exp}) (Nei, 1978) per population unit (with N ≥ 5) were estimated with GENETIX 4.05 (Belkhir *et al.*, 1996). Allelic richness (*Ar*) using rarefaction method (minimum of 5 diploid individuals

Table IV-S1 : Microsatellite *loci* information with indication of multiplex group (Mix 1 to 4), original marker name, name of primers used for the study, primer's nucleotide sequence, microsatellite motive repeated, fluorochrome used to mark primers, range of detected allele size and number of detected alleles for all individuals in Seychelles (N_{Allele}, n = 186), and frequencies of null alleles for each marker.

Multiplex group	Original marker name	Name of primer	Nucleotidic sequence	Motive	Fluorochrome	Range of alleles size (bp)	$N_{alleles\ detected}$	Null alleles
Mix 1	A113	A113-F	5'- CTCGAATCGTGGCGTCC -3'	$(TC)_5TT(TC)_8TT(TC)_5$	VIC	198 - 218	6	0.009
		A113-R	5'- CCTGTATTTTGCAACCTCGC -3'					
	A024	A24-F	5'- CACAAGTTCCAACAATGC -3'	$(CT)_{11}$	FAM	92 - 102	5	0.036
		A24-R	5'- CACATTGAGGATGAGCG -3'					
	AC306	AC306-a	5'- GAATATGCCGCTGCCACC -3'	$(CT)_{11}$	FAM	165 - 179	5	0.297
		AC306-b	5'- TTTCGTTGCATCCGAGCG -3'					
	AP055	AP55-1	5'- GATCACTTCGTTTCAACCGT -3'	$(TC)_9..(TC)_{12}$	PET	175 - 207	10	0.023
		AP55-2	5'- CATTCGGTATGGTACGACCT -3'					
Mix 2	A088	A88-F	5'- CGAATTAACCGATTTGTCG -3'	$(CT)_{10}..(GGA)_7$	VIC	136 - 151	5	0.000
		A88-R	5'- GATCGCAATTATTGAAGGAG -3'					
	A107	A107-1	5'- CCGTGGGAGGTTTATTGTCG -3'	$(CT)_{23}$	VIC	138 - 178	12	0.441
		A107-2	5'- GGTTCGTAACGGATGACACC -3'					
	A028	A28-F	5'- GAAGAGCGTTGGTTGCAGG -3'	$(AG)_6(GAG)_6$	FAM	132 - 138	5	0.013
		A28-R	5'- GCCGTTCATGGTTACCACG -3'					
	A029	A29-2	5'- CAACTTCAACTGAAATCCG -3'	$(CA)_{24}$	NED	126 - 164	16	0.014
		A29-1	5'- AAACAGTACATTTGTGACCC -3'					
	AP289	AP289-a	5'- AGCTAGGTCTTTCTAAGAGTGTTG -3'	$(GA)_5$	NED	184 - 236	8	0.014
		AP289-b	5'- TTCGACCGCAATAACATTC -3'					
	AP273	AP273-a	5'- GATCTTGTGTTAAACAGCCG -3'	$(CT)_8$	PET	106 - 110	2	0.015
		AP273-b	5'- GATCTCTGGCAGACGAAGAG -3'					
	(A)B124	B124-1	5'- GCAACAGGTCGGGTTAGAG -3'	$(CT)_8..(CT)_{14}..(GGCT)_8$	PET	212 - 236	10	0.039
		B124-2	5'- CAGGATAGGGTAGGTAAGCAG -3'					
Mix 3	A008	A8-1	5'- CGAAGGTAAGGTAAATGGAAC -3'	$(GA)_{15}...(GCTCG)_5$	VIC	165 - 181	7	0.011
		A8-2	5'- GGCGGTTAAAGTTCTGG -3'					
	A035	A35-1	5'- GTACACGGTTGCACGGTTG -3'	$(GT)_{14}$	FAM	94 - 113	5	0.031
		A35-2	5'- CTTCGATGGTCGTTGTACCC -3'					
	AP033	AP33-1	5'- TTTCTTTTTGTGGACAGCG -3'	$(CT)_{15}$	PET	225 - 249	11	0.000
		AP33-2	5'- AAATATGGCGAAACGTGTG -3'					
Mix 4	AP066	AP66-1	5'- TTGCATTCGGTCTCCAGC -3'	$(CT)_{11}$	VIC	92 - 114	6	0.069
		AP66-2	5'- ACTTGCCGCGGTATCTGA -3'					
	AP043	AP43-1	5'- GGCGTGCACAGCTTATTCC -3'	$(TA)_6GATA(GA)_{10}$	FAM	129 - 185	11	0.000
		AP43-2	5'- CGAAGGTGGTTTCAGGCC -3'					
	A043	A43-1	5'- CACCGAAACAAGATGCAAG -3'	$(CT)_{12}$	PET	124 - 152	5	0.046
		A43-2	5'- CCGCTCATTAAGATATCCG -3'					

at intra-Seychelles level or 43 at inter-populations level), F_{IS} per population and population pairwise F_{ST} were calculated with FSTAT 2.9.3.2 software (Goudet, 2001c). Deviation from Hardy Weinberg equilibrium (HWE) and genetic differentiation between population pairs were tested using GENEPOP 3.4 (Raymond and Rousset, 2004).

STRUCTURE 2.3.3 software (Pritchard *et al.*, 2000), was used to infer population structure and to estimate the most likelihood value of K (given number of genetic clusters). Bayesian clustering method was set to admixture model and correlated allele frequencies. Considering K = 1 to 20, 10^5 burn-in steps and 10^6 iterations of MCMC algorithm were run 10 times per K. Optimal number of clusters was estimated using ΔK method described by Evanno *et al.* (2005) and computed with STRUCTURE HARVESTER online (Earl and vonHoldt, 2011). Contrary to STRUCTURE, the INSTRUCT software (Gao et al, 2007) takes inbreeding into account and does not require the *prior* assumption of HWE within clusters. Given that some populations showed departures from HWE, population structure analysis was also computed with INSTRUCT and the outputs were compared to the ones from STRUCTURE. The program was run with 10 chains for K = 1 to 10 (10^4 burn-in steps and $2x10^5$ iterations). Graphical outputs were constructed with CLUMPP 1.1.2 (Jakobsson and Rosenberg, 2007) and DISTRUCT 1.1 (Rosenberg, 2004).

Principal Components Analysis (PCA) and Discriminant Analysis of Principal Components (DAPC) (Ramasamy *et al.*, 2014) were also used to investigate genetic structure and/or differentiation between the three island populations and reference populations, using R 3.0.2 software (Team, 2005) and adegenet 1.3 - 9.2 package (Jombart, 2008).

Table IV-2 : Mitochondrial sequences distribution and nuclear genetic diversity indices (based on 15 microsatellites *loci*) per site and island. N_{colony}: number of colonies sampled and analysed; N_a, mean number of alleles; H_{obs}, observed heterozygosity; H_{exp}, expected unbiased heterozygosity; F_{IS}, fixation index; level of statistical significance of the tests for HWE is indicating by * for P < 0.05. Standard deviation is indicated in parentheses.

Island	Site	N_{colony}	A1_Mad3	A1_Sey1	A1_Sey2	Z2_Sey1	N_a	H_{obs}	H_{exp}	F_{IS}
Mahé	S1	6	4				3.80 (± 1.26)	0.567 (± 0.250)	0.593 (± 0.221)	0.049
	S2	5	2	1			3.67 (± 1.05)	0.560 (± 0.264)	0.618 (± 0.186)	0.104
	S3	7	3	1			3.93 (± 1.67)	0.552 (± 0.264)	0.610 (± 0.155)	0.101
	S4	1	1				-	-	-	-
	S5	1	1				-	-	-	-
	S6	1	1				-	-	-	-
	S7	2	1	1			-	-	-	-
	S8	13	7				4.73 (± 1.62)	0.554 (± 0.187)	0.561 (± 0.174)	0.014
	S9	7	6				3.47 (± 1.06)	0.586 (± 0.216)	0.574 (± 0.199)	-0.023
	S10	1	1				-	-	-	-
	S11	1	1				-	-	-	-
	S12	1	1				-	-	-	-
	S13	9	8				4.07 (± 1.44)	0.590 (± 0.187)	0.570 (± 0.175)	-0.038
	S14	7	3		1		3.93 (± 1.28)	0.632 (± 0.199)	0.615 (± 0.150)	-0.029
	S15	1	1				-	-	-	-
	S16	2	2				-	-	-	-
	S17	6	3				3.53 (± 1.19)	0.556 (± 0.272)	0.584 (± 0.189)	0.053
Praslin	S18	17	9				4.00 (± 1.46)	0.579 (± 0.183)	0.536 (± 0.181)	-0.084
	S19	1	1				-	-	-	-
	S20	1	1				-	-	-	-
	S21	2	2				-	-	-	-
	S22	1	1				-	-	-	-
	S23	6	3				3.00 (± 0.93)	0.500 (± 0.282)	0.517 (± 0.210)	0.036
	S24	1	1				-	-	-	-
	S25	1	1				-	-	-	-
	S26	3	3				-	-	-	-
	S27	2	1			1	-	-	-	-
	S28	1	1				-	-	-	-
	S29	34	19				4.60 (± 2.32)	0.502 (± 0.195)	0.542 (± 0.174)	0.074*
	S30	1				1	-	-	-	-
La Digue	S31	38	19			4	4.13 (± 1.73)	0.502 (± 0.168)	0.523 (± 0.166)	0.041
	S32	5	3				2.80 (± 1.08)	0.520 (± 0.345)	0.476 (± 0.253)	-0.106
Mahé		71	46	3	1		6.73 (± 3.37)	0.574 (± 0.145)	0.592 (± 0.142)	0.032
Praslin		71	43			2	5.00 (± 2.17)	0.523 (± 0.162)	0.534 (± 0.173)	0.021
La Digue		43	22			4	4.20 (± 1.78)	0.504 (± 0.179)	0.517 (± 0.172)	0.025
TOTAL		**185**	**111**	**3**	**1**	**6**	**7.47 (± 3.54)**	**0.538 (± 0.143)**	**0.568 (± 0.151)**	**0.054***

3. Results

3.1. Mitochondrial diversity of the COI-COII region

For the Seychelles archipelago, all individuals (*n* = 186) were successfully amplified for the intergenic COI-COII region of mtDNA. Two amplicon sizes were observed: i) 180 individuals carried the P_0Q sequence type (fragment length around 640bp) and ii) six samples had the P_0QQ sequence type (around 840 bp). After PCR-RFLP analyses, two distinct restriction fragment patterns were detected. Individuals with P_0Q type showed restriction profile similar to the haplotype A1 (~47, 109, 482 bp) already described by Franck *et al.* (2001). Fragment profiles observed after restriction of P_0QQ type were similar to the O1' haplotype pattern (~47, $(67)^2$, 107, 129, 419 bp) described by Franck *et al.* (2001) but renamed Z2 by Alburaki *et al.* (2011). Sequence diversity was assessed by sequencing the intergenic COI-COII region of 121 individuals (Table IV-2). Sequencing revealed that A1 restriction profile (*n* = 180, Table IV-3) corresponded to three different sequences:

i) A1_Mad3 (KF976994) described in the *A. m. unicolor* population (African lineage) in Madagascar (Rasolofoarivao *et al.*, 2015).

ii) A1_Sey1 (KM594572), a newly described sequence which shares 99% of similarity with Malagasy sequences and the closest one was A1_Mad3 (1bp transversion, Table IV-S2). Alignment comparisons with A1 reference sequences showed that the second closest subspecies is *A. m. litorea* (A27 sequence, Somalia) with five nucleotide differences (3bp deletion/insertion, 1bp transversion and 1bp transition; FJ477983 from Franck *et al.* (2001), Table IV-S2).

iii) A1_Sey2 (KM594573) another newly described sequence, 99% similar to A1_Mad3 (1bp transition, Table IV-S2) and to A1_Sey1 (1bp transversion and 1bp transition).

The (O1') Z2 restriction profile (*n* = 6, Table IV-3) actually corresponded to a new sequence that we named Z2_Sey1 (KM594574). This sequence shared 99% of similarity with the following described ones: O5 (1bp deletion, FJ743633) found in the USA

Table IV-3 : Mitochondrial and nuclear genetic diversity indices (based on 14 comparable microsatellites *loci*) for the Seychelles islands compared to reference populations of Madagascar and Italy. PCR-RFLP haplotypes of the COI-COII intergenic region are indicated for each population. Ar_{43}, the allelic richness based on a minimum of 43 diploid individuals, H_{obs} and H_{exp}, observed and expected unbiased heterozygosity; F_{IS}, fixation index; statistical significance of the tests for HWE is indicating by * for P < 0.005. Standard deviation is indicated in parentheses.

Population	N_{colony}	A1	A4	Z2	C1	M7	Ar_{43}	H_{obs}	H_{exp}	F_{IS}
Mahé	72	72					6.23 (± 2.99)	0.573 (± 0.150)	0.587 (± 0.146)	0.024
Praslin	71	69		2			4.80 (± 2.05)	0.530 (± 0.166)	0.540 (± 0.178)	0.018
La Digue	43	39		4			4.29 (± 1.82)	0.500 (± 0.185)	0.514 (± 0.178)	0.028
Madagascar	##	105	2				6.87 (± 4.83)	0.399 (± 0.244)	0.428 (± 0.267)	0.068*
Italy	49				30	19	7.22 (± 3.38)	0.477 (± 0.289)	0.474 (± 0.295)	-0.007

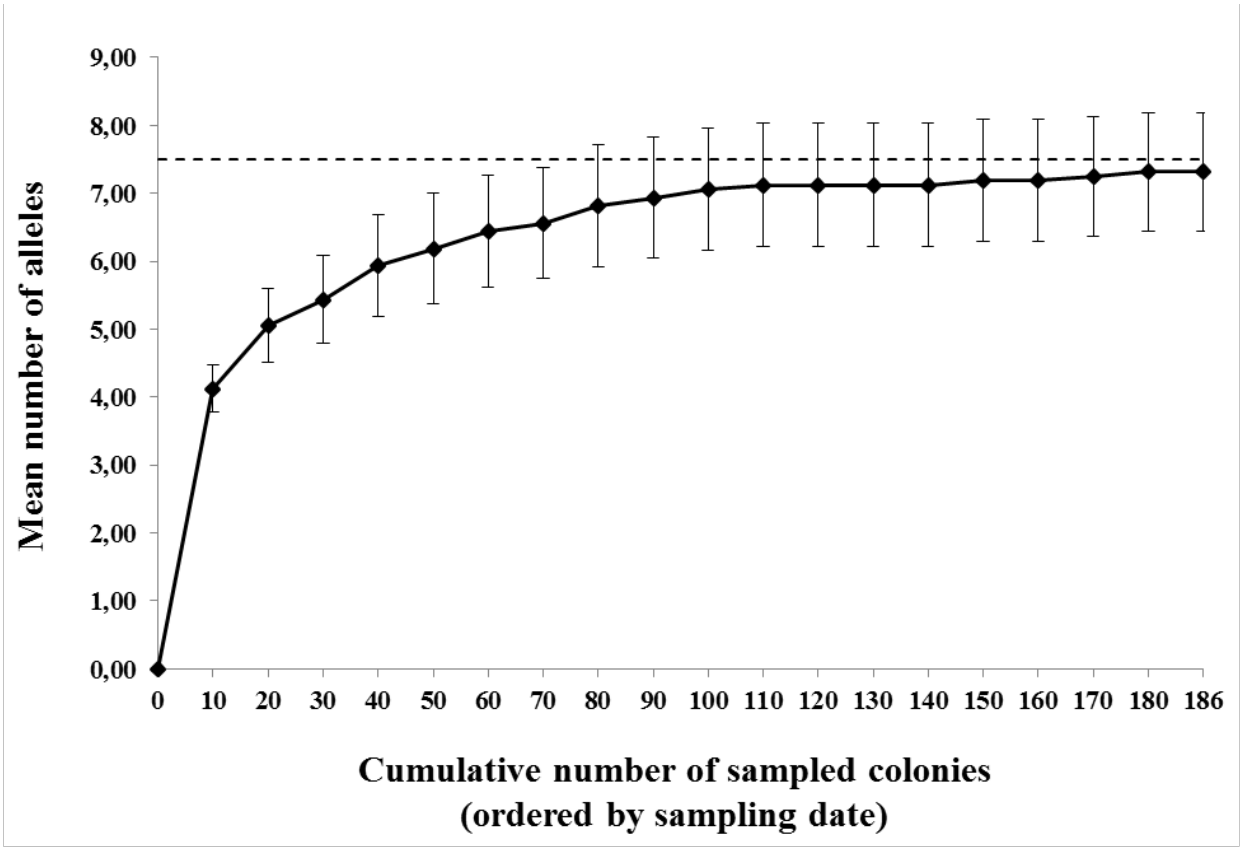


Figure IV-S1 : Sampling effort represented by the cumulative number of colonies sampled (ordered by sampling date) and mean number of alleles per locus for 15 microsatellites *loci* (± standard deviations). The dotted line represented the asymptote where the mean number of alleles is 7.5.

honeybee population (Szalanski and Magnus, 2010), Z2 (1bp insertion, HM236206) in Syrian *A. m. syriaca* populations by Alburaki *et al.* (2011) and O1'/Z2 (1bp deletion and 2bp substitution/transition, KC149979) detected in *A. m. jemenitica* populations in Saudi Arabia (Alattal *et al.*, 2014). A1_Mad3 was the most frequent sequence observed (91.7%) and was detected in all sites except in S30 (Praslin) (Table IV-2). Z2_Sey1 (5.0%) was distributed in two sites of Praslin and one in La Digue. Finally, A1_Sey1 (n = 3) and A1_Sey2 (n = 1) were only found in Mahé (Table IV-2).

For the Malagasy reference population, after PCR-RFLP, 105 individuals carried the A1 haplotype (P_0Q sequence) and two had the A4 haplotype (P_0QQ sequence) (Table IV-3 (Rasolofoarivao *et al.*, 2015)). Concerning Italian samples, two amplicon sizes and associated PCR-RFLP profiles were observed: i) 30 individuals with Q sequence type corresponding to the haplotype C1 and ii) 19 individuals with PQQ sequence type corresponding to the haplotype M7; both were already described as characteristics of *A. m. ligustica* populations (Franck *et al.*, 2001, Franck *et al.*, 2000a).

3.2. Nuclear microsatellite genetic diversity

At the intra-Seychelles level, two markers A107 and AC306 were removed from the analyses due to high null allele frequencies (44.1 and 29.7%, respectively), and 185 individuals were considered as successfully genotyped. After Bonferroni corrections, 14 combinations of *loci* out of 120 were significantly linked but did not involve the same *loci* in each pair. Number of detected alleles per *locus* (n = 185) ranged from 2 alleles for B124 to 16 for A29 (Table IV-S1). Based on 15 *loci*, all sites harboured comparable genetic diversity, and allelic richness (Ar_5) ranged from 2.80 (± 1.08) for S32 to 3.67 (± 1.05) for S2 (Table IV-2). Allelic richness value (minimum of 43 diploid individuals) was significantly higher in Mahé with 6.07 (± 1.82) than in La Digue and Praslin with 4.67 (± 1.95) and 4.13 (± 1.75), respectively (two sided test, P = 0.076). No differences were observed between the allelic richness of wild (n = 6, 3.53 ± 1.12) and managed colonies (n = 65, 3.69 ± 1.05) in Mahé (Student test, paired, P = 0.797). An asymptotic relationship was observed between the cumulative number of sampled colonies and the mean

Table IV-4 : A) F_{ST} values per pair of sites within the Seychelles archipelago (N > 5 individuals, based on 15 microsatellites *loci*) with indication of the level of statistical significance for the permutation tests after Bonferroni corrections (* P < 0.0167). B) F_{ST} values per pair of islands and/or reference populations based on 14 comparable microsatellites *loci*, statistical significance for the permutation tests after Bonferroni corrections is indicated by * (P < 0.005). ¤ Among Seychelles islands F_{ST} values were identical using 14 or 15 *loci*.

A)		Mahé								Praslin			La Digue
		S01	S02	S03	S08	S09	S13	S14	S17	S18	S23	S29	S31
Mahé	S02	-0.048											
	S03	-0.017	-0.027										
	S08	0.014	-0.023	0.008									
	S09	0.054	0.008	0.036	0.032								
	S13	0.007	-0.007	-0.000	0.005	0.043							
	S14	0.015	-0.013	-0.018	0.003	0.008	-0.005						
	S17	0.016	0.003	0.007	0.005	0.035	-0.004	0.014					
Praslin	S18	**0.079***	**0.072***	0.051	**0.059***	**0.094***	**0.088***	**0.080***	**0.097***				
	S23	0.011	0.008	0.002	0.027	**0.066***	**0.040***	**0.032***	**0.052***	0.007			
	S29	**0.070***	**0.049***	0.031	**0.039***	**0.066***	**0.068***	**0.057***	**0.071***	0.003	-0.010		
La Digue	S31	**0.048***	**0.046***	**0.038***	**0.040***	**0.090***	**0.062***	**0.054***	**0.075***	**0.027***	0.013	0.017	
	S32	0.015	0.030	0.000	0.039	0.080	0.060	0.042	0.071	0.027	-0.009	0.001	-0.013

B)	Mahé	Praslin	La Digue	Madagascar	
Praslin	**0.053***				¤ 15/14 *loci*
La Digue	**0.051***	**0.015***			
Madagascar	**0.150***	**0.163***	**0.147***		14 *loci*
Italy	**0.288***	**0.328***	**0.369***	**0.488***	

number of alleles per locus (Figure IV-S1). Sampling effort could therefore be considered as representative of the honeybee genetic diversity on these three islands (Pons and Chaouche, 1995). Only one site (S29) over the 32 showed significant difference from the expected heterozygosity of the Hardy-Weinberg model (F_{IS} = 0.074, P = 0.0018) (Table IV-2). At the island scale, observed heterozygosity ranged from 50.4% (± 17.9%) in Mahé to 57.4% (± 14.5%) in La Digue with no significant deviation from HWE. When considering the archipelago as one single population, significant departure from HWE was detected (F_{IS} = 0.054, P < 0.05) with a deficiency of heterozygosity (Table IV-2).

For the two reference populations, A43 *locus* did not correctly amplified and was removed from inter-populations analyses to avoid any bias. So, based on 14 comparable *loci*, reference populations had higher allelic richness indices (based on 43 diploid individuals) than in Seychelles archipelago with 7.22 (± 3.38) for Italy followed by 6.87 (± 4.83) for Madagascar (Table IV-3). However, heterozygosity levels were higher in the Seychelles islands than in reference populations (Table IV-3). No significant departure from HWE was observed for the Italian population while in Madagascar significant disequilibrium was detected (F_{IS} = 0.068, P = 0.005), probably resulting from a Whalund effect due to the pooling of geographical distant individuals which also belonged to two different genetic groups (Rasolofoarivao *et al.*, 2015).

3.3. Genetic differentiation and population structure

At the intra-Seychelles level (15 *loci*), genetic differentiation among sites, estimated by pairwise F_{ST} ranged from -0.048 (S01 - S02) to 0.097 (S17 – S18) (Table IV-4A). After Bonferroni corrections, 27 sites pairs on the 78 tested, showed significant genetic differentiation (p-value < 0.0167). None of these significant pairs involved sites from a same island (Table IV-4A). Genetic differentiation estimates were significant between all islands and were much higher for the two pairs Mahé-Praslin (F_{ST} = 0.054) and Mahé-La Digue (F_{ST} = 0.048) than for Praslin-La Digue (F_{ST} = 0.014) (P < 0.0167) (Table IV-4A). PCA analysis based on 185 individual multilocus genotypes also exhibited differentiation between islands (Figure II-2A).

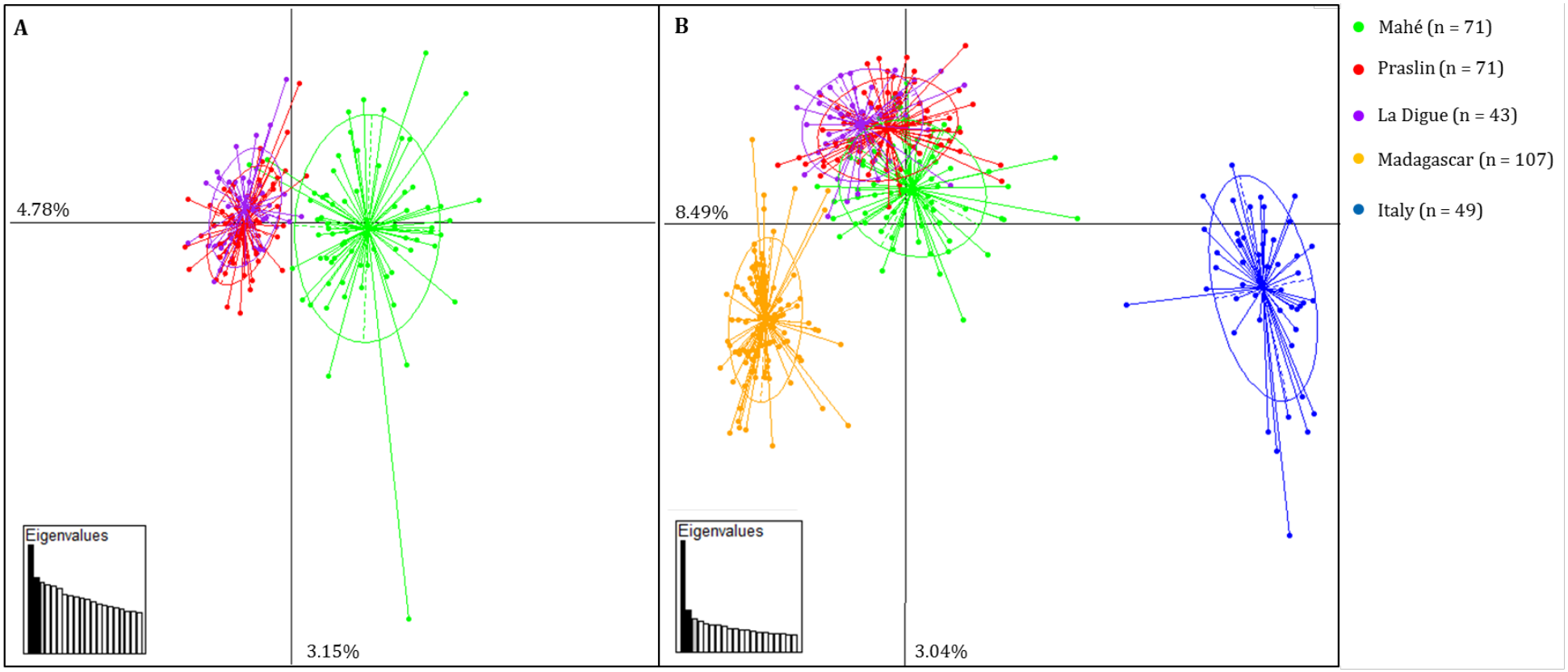
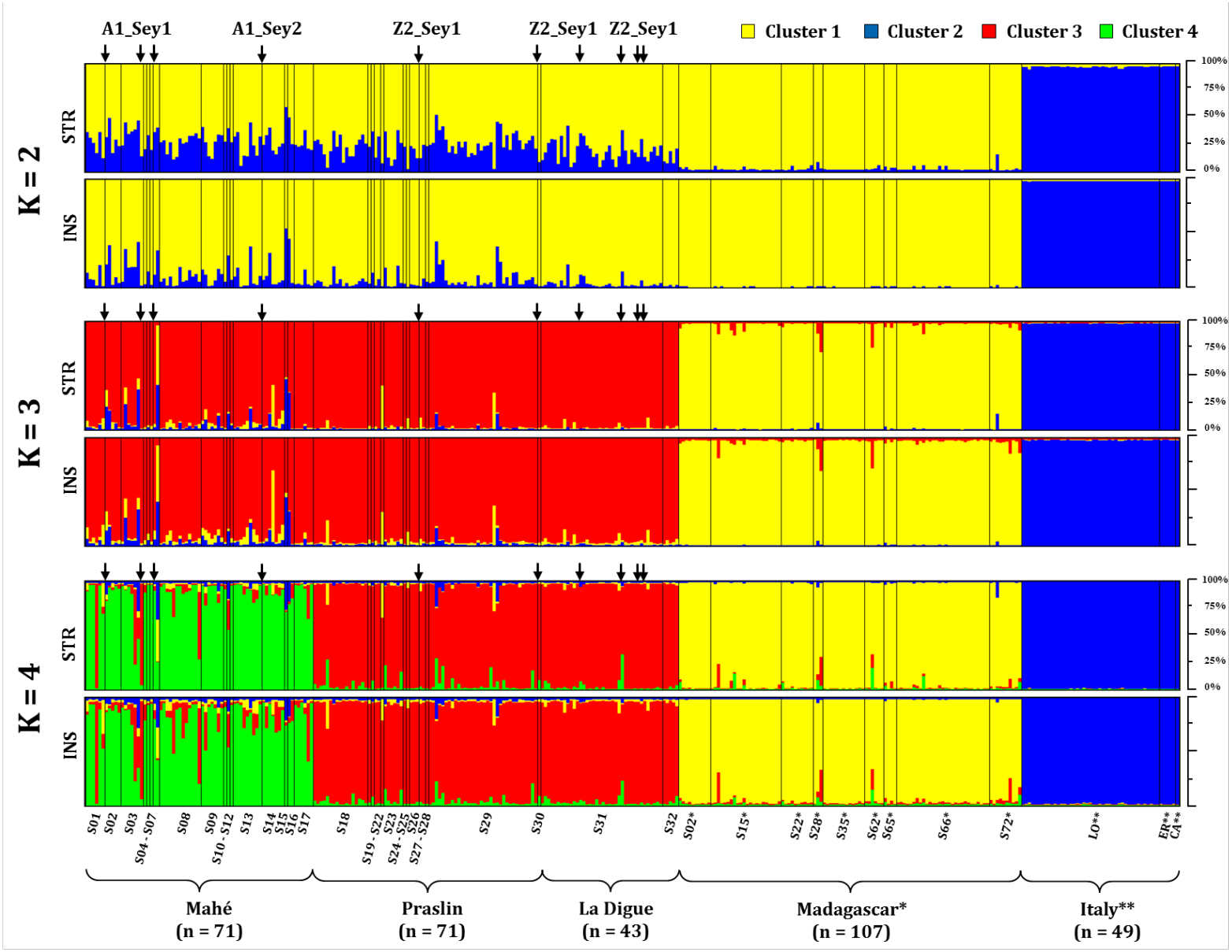


Figure IV-2 : PCAs based on 341 individual multilocus genotypes using R Adegenet package (Jombart, 2008), confidence interval (by default at 68%) is indicated by elipse and inertia is indicated on each axis. A) PCA based on 15 microsatellites *loci* (112 variables = alleles), colors indicate the sampled islands of the Seychelles archipelago with individuals from Mahé, Praslin and La Digue and in B) PCA based on 14 comparable microsatellites *loci* (155 variables) of the Seychellian samples and the reference populations with Madagascar (*n* = 107) and Italy (*n* = 49).

Two graphical clusters were detected; one with individuals from Mahé (n = 71), the other comprising all individuals from Praslin (n = 71) and La Digue (n = 43) (Figure II-2A). Considering a threshold of 90% of absolute contribution to axis 1, 12 alleles on the 105 detected explained the islands differentiation (AP24-$_{96\text{-}102}$, AP55-$_{175\text{-}183\text{-}207}$, A88-$_{136}$, A8-$_{181}$, AP33-$_{233\text{-}249}$, AP66-$_{104}$, AP43-$_{129}$ and A43-$_{126}$).

At the inter-populations level including Malagasy and Italian populations (14 *loci*), pairwise F_{ST} were all significant and higher than among the Seychelles islands (Table IV-4B). Genetic differentiation between Italy and Seychelles islands (F_{ST} = 0.288 to 0.369) was at least two times higher than between Madagascar and the Seychelles islands (F_{ST} = 0.147 to 0.163). PCA on all multilocus genotypes (n = 341, Figure II-2B) corroborated F_{ST} results with a moderate genetic differentiation between Seychellian and Malagasy colonies and a higher separation between Seychellian and Italian scatters.

Results from STRUCTURE (STR)/INSTRUCT (INS) showed a population structure at both inter-populations and intra-Seychelles levels (Figure II-3, Figure II-S2 and Figure II-S3). According to Evanno *et al.* (2005), the most probable model considered two genetic clusters (14 *loci*, ΔK_2 = 2892.27, Figure II-3). However, from an ecological perspective the optimal model was rather four genetic clusters in which an intra-Seychelles structure appeared (n = 341, 14 *loci*, ΔK_4 = 432.77, Figure II-3). This intra-archipelago structure was confirmed by independent runs based on 15 *loci* (Fig. S2). INS output at K = 2 was the most reliable as the overall Seychellian population and Malagasy one showed significant departure from HWE. Considering K = 3 and 4, STR and INS outputs were similar. At K = 2, all Malagasy samples were assigned to cluster 1 (yellow) with a posterior probability (PP) > 97.6% (INS) while Italian samples were all assigned to cluster 2 (blue) with PP > 99.1% (INS) (Figure II-3). When Bayesian analyses were corrected for inbreeding at K = 2, all Seychellian samples were mainly assigned to the Malagasy cluster (yellow). Nevertheless at K = 3, all Seychellian individuals were genetically differentiated from reference populations by being mostly assigned to a third cluster (red) while Malagasy individuals remained assigned to the cluster 1 (yellow) and Italian individuals to the cluster 2 (blue) (Figure II-3).


A1_Sey1
A1_Sey2
Z2_Sey1
Z2_Sey1
Z2_Sey1
Cluster 1
Cluster 2
Cluster 3
Cluster 4
K = 2
K = 3
K = 4
STR
INS
100%
75%
50%
25%
0%
S01
S02
S03
S04 - S07
S08
S09
S10 - S12
S13
S14
S15
S16
S17
S18
S19 - S22
S23
S24 - S25
S26
S27 - S28
S29
S30
S31
S32
S02*
S15*
S22*
S28*
S35*
S62*
S65*
S66*
S72*
LO**
ER**
CA**
Mahé
(n = 71)
Praslin
(n = 71)
La Digue
(n = 43)
Madagascar*
(n = 107)
Italy**
(n = 49)

🡸 **Figure IV-3 :** Structure of the nuclear genetic diversity of the Seychellian samples and comparison with reference populations based on 14 microsatellites *loci*. Plots represent graphical output of STRUCTURE (STR) and INSTRUCT (INS) with admixture model, assuming K = 2, 3 and 4 genetic clusters. Each individual is represented by a single vertical line (*n* = 341) and sites are delimited by black vertical lines associated with island and reference population names below the last plot. Each color represents a genetic cluster. Individuals which have a mtDNA sequence different from the dominant one (A1_Mad3) in the Seychelles archipelago are indicated by arrows. * Malagasy samples (*n* = 107) and sites from Rasolofoarivao et al. (in press, DOI 10.1007/s13592-015-0362-1) and ** Italian samples (*n* = 49, LO: Lombardy, ER: Emilia-Romagna and CA: Campania) from the collection of Pierre Franck and INRA Avignon.

Considering the optimal model with K = 4, the intra-structure of the archipelago emerged from the global structure with most of Mahé individuals gathered in the cluster 4 (green) and Praslin-La Digue individuals assigned to the cluster 3 (red) (Figure II-3). At K = 4, five individuals of Mahé were assigned to the Praslin-La Digue cluster (PP > 56.4%) and four samples from Praslin-La Digue were assigned to Mahé cluster but in lower levels (PP < 21.2%) (Figure II-3). Seychelles population structuration was not explained by beekeepers origin or maternal lineages (Figure II-3). Individuals carrying Z2_Sey1 sequence in Praslin and La Digue (PP ranging from 71.4% to 96.4% for cluster 3 red) did not showed differences concerning assignment PP compared to A1 haplotype individuals. For K = 4, the estimated mean PP value of Seychellian samples assigned to the Malagasy cluster was of 3.4% and 2.3% for the Italian cluster. Only 13 individuals from the Seychelles had non-negligible PP values for the cluster of Madagascar ranging from 10.3 and 31.7% and eight for the Italian cluster (PP values = [11.9 – 27.7%] Figure II-3). DAPC analyses corroborated the four genetic groups detected with STR and INS (Figure II-S4). None of the Seychellian samples were assigned to the Italian cluster according to the DAPC analysis.

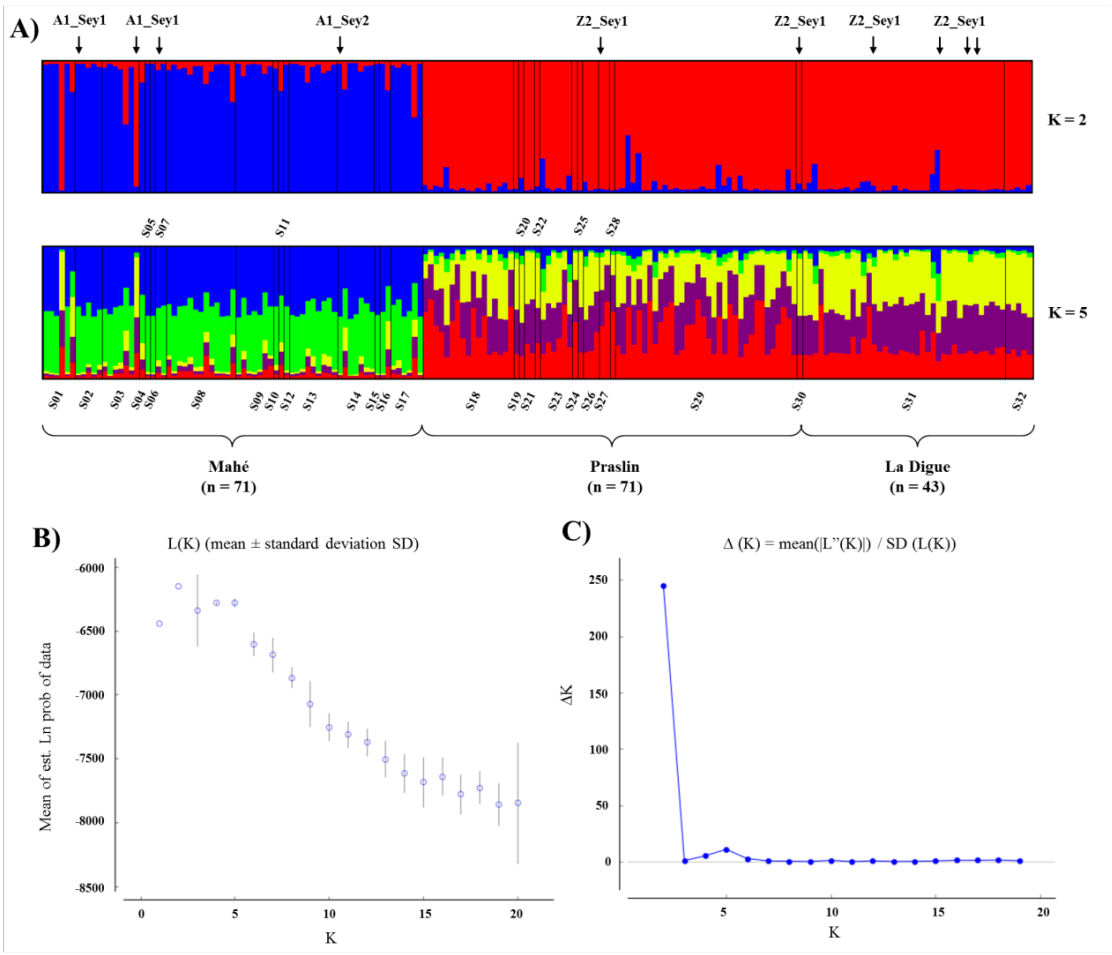


Figure IV-S2 : A) STRUCTURE plots (Pritchard *et al.*, 2000) assuming K = 2 and 5 for the Seychellian samples, based on 15 microsatellites *loci*. Sites within islands are separated by black lines and indicated by the legend below the second plot. B) Average likelihood of runs in STRUCTURE L(K) along with number of K clusters, C) ΔK, estimator of the optimal number of clusters (K) according to Evanno et al. (2005). The B and C graphs were done using Structure Harvester (Earl and vonHoldt, 2011).

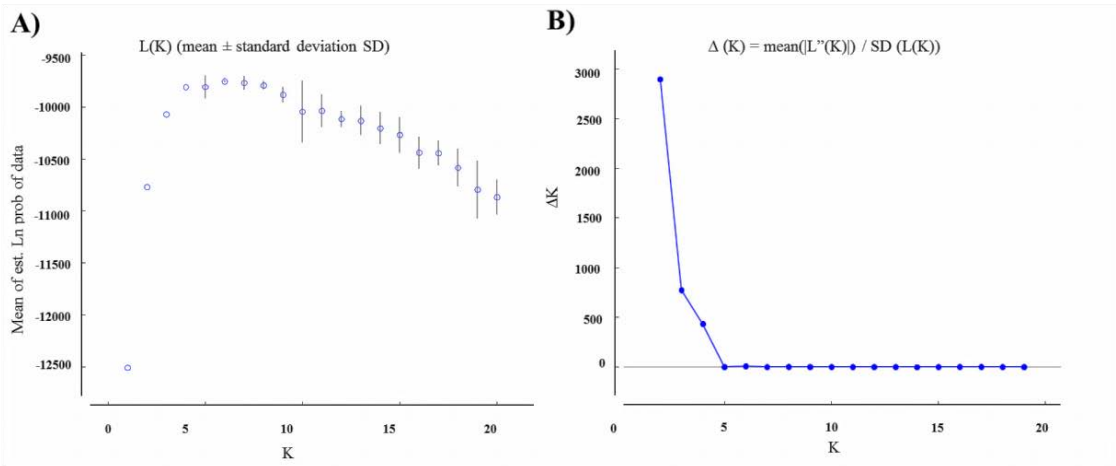


Figure IV-S3 : A) Average likelihood of runs in STRUCTURE L(K) along with number of K clusters based on 14 microsatellites *loci* for the Seychelles and the two reference populations: Madagascar and Italy, B) ΔK, estimator of the optimal number of clusters (K) according to Evanno et al. (2005). The two graphs were done using Structure Harvester (Earl and vonHoldt, 2011).

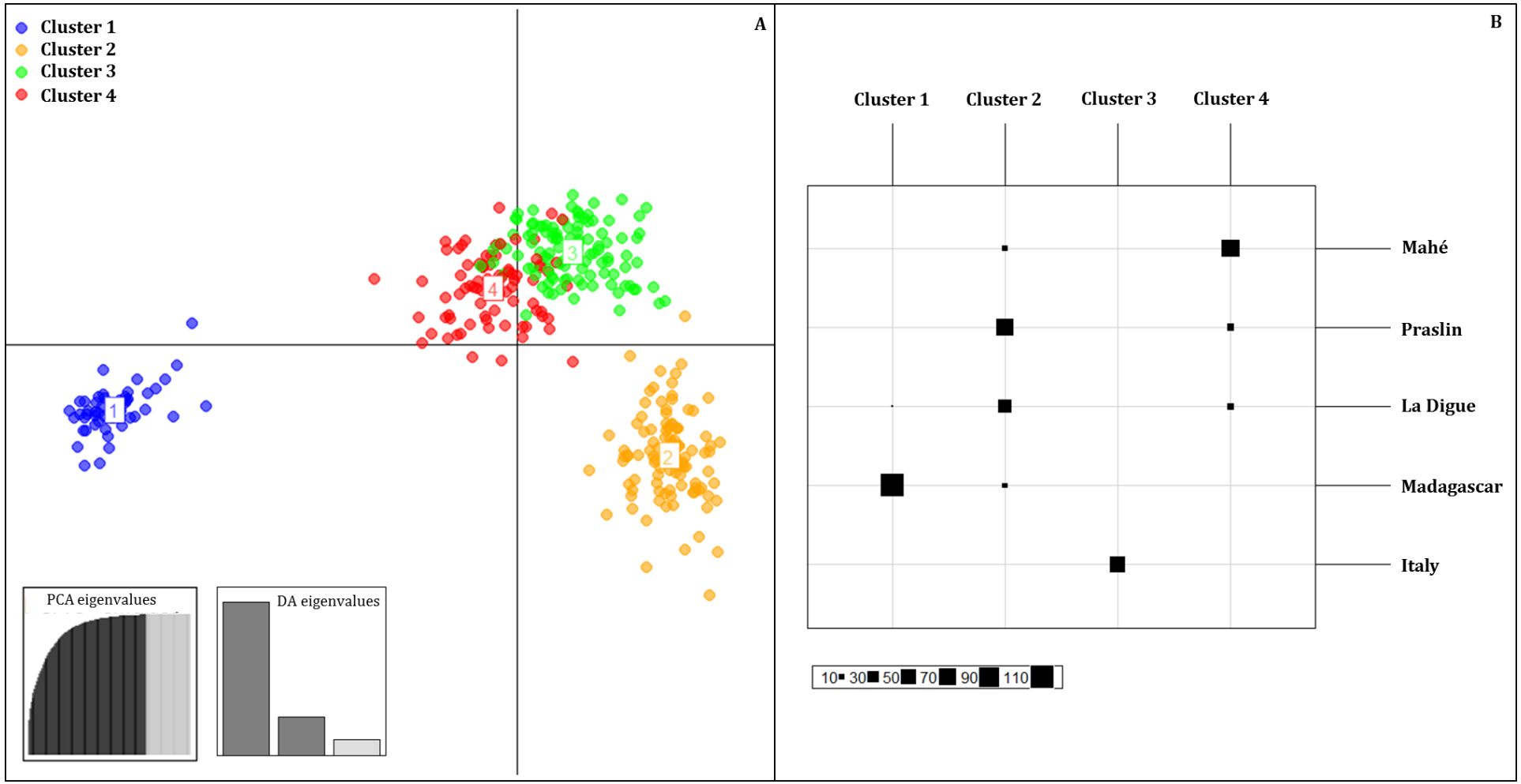


Figure IV-S4 : A) DAPC based on individual genotypes of Seychellian honeybee samples (*n* = 185) and reference populations of Madagascar (*n* = 107) and Italy (*n* = 49) using 14 comparable *loci*. Dots of different colors indicate individuals from different genetic clusters (K = 4). PCs eigenvalues and discriminant factors retained are indicated. B) Number of individuals of each island/reference populations into the four DAPC genetic clusters.

Table IV-S2: Nucleotide alignment details and variations among the Seychellian A_I sub-lineage detected sequences compared to highly similar A1 sequences from *A. m. unicolor* in Madagascar and other subspecies. Dot indicates same nucleotide identity as the first sequence (A1_Sey1) and "–" represents a deletion.

				Alignment nucleotide position																								
Sequence	***Accession***	***Location***	***Subspecies***	31	36	70	76	77	78	79	80	87	89	97	109	127	149	151	163	164	172	213	232	294	298	331	406	515
A1_Sey1	KM594572	Seychelles		_	T	A	A	C	A	A	A	C	A	T	T	_	A	_	_	_	T	T	T	_	_	T	C	G
A1_Sey2	KM594573	Seychelles		_	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	A	_	·	_	_	_	·	·	·	_	_	C	·	·
A1_Mad3	KF976994	Madagascar Seychelles	*A. m. unicolor*	_	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	A	_	·	_	_	_	·	·	·	_	_	·	·	·
A1_Mad4	KF976995	Madagascar	*A. m. unicolor*	A	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	A	_	·	_	_	_	·	·	·	_	_	·	·	·
A1_Mad5	KF976996	Madagascar	*A. m. unicolor*	_	·	_	·	·	·	·	·	·	·	·	A	_	·	_	_	_	·	·	·	_	_	·	·	·
A1_Mad6	KF976997	Madagascar	*A. m. unicolor*	_	·	·	_	_	_	_	_	·	·	·	A	_	·	_	_	_	·	·	·	_	_	·	·	·
A1_Mad7	KF976998	Madagascar	*A. m. unicolor*	_	·	·	·	·	·	·	·	·	·	A	A	_	·	_	_	_	·	·	·	_	_	·	·	·
A1_Mad8	KF976999	Madagascar	*A. m. unicolor*	_	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	A	_	·	_	A	A	·	·	·	_	_	·	·	·
A1_Mad9	KF977000	Madagascar	*A. m. unicolor*	_	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	A	_	·	_	_	_	·	_	·	_	_	·	·	·
A1_Mad10	KF977001	Madagascar	*A. m. unicolor*	_	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	A	_	·	_	_	_	·	·	A	_	_	·	·	·
A1_Mad13	KF977004	Madagascar	*A. m. unicolor*	_	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	A	_	·	_	_	_	·	·	·	_	T	·	·	·
A1_Mad14	KF977005	Madagascar	*A. m. unicolor*	_	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	A	_	·	_	_	_	·	·	·	_	_	·	T	·
A1_Mad15	KF977006	Madagascar	*A. m. unicolor*	_	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	A	_	·	_	_	_	·	·	·	_	_	·	·	A
A27	FJ477983	Somalia	*A. m. litorea*	_	_	·	_	·	·	·	·	·	·	·	A	C	·	_	_	_	·	·	·	_	_	C	·	·
A8	FJ477981	Morocco	*A. m. intermissa*	_	·	·	_	·	·	·	·	·	·	·	A	_	G	A	_	_	_	·	·	T	_	C	·	·
A1c	FJ477986	Zambia	*A. m. adansonii*	_	·	·	_	·	·	·	·	T	G	·	A	_	·	A	_	_	_	·	·	T	_	C	·	·
A1b	FJ477985	Spain	*A. m. iberiensis*	_	·	·	_	·	·	·	·	·	·	·	A	_	·	A	_	_	_	·	·	T	_	C	·	·

At least four characteristic alleles of the C lineage described by Garnery *et al.* (1998b) were found in the dataset (A113-$_{214}$, A28-$_{138}$, AP43-$_{143_145}$) (Table IV-S3). Considering one base pair of pic reading difference, four more alleles were detected with A88-$_{151}$ (named 152 by Garnery *et al.* (1998b)), A8-$_{165}$ (166), A43-$_{126_140}$ (127 and 141). Thus the allele A28-$_{137}$ could also correspond to A28-$_{138}$ considering one pb of difference and was found in Mahé population. On the eight potential diagnostic alleles, three were also observed in Malagasy samples and seven in the Italian dataset (Table IV-S3). Diagnostic allele frequencies were globally low in the Seychelles archipelago except for the allele A43-$_{140}$ which was found dominant in all islands (Table IV-S3).

4. Discussion

Mitochondrial COI-COII analyses bring to light the exclusive presence of the African lineage in the three main islands of the Seychelles archipelago. Two mitochondrial African sub-lineages were detected and in different proportions: the A_I sub-lineage was dominant in all three islands (96.7% of the colonies) while Z2 sub-lineage was only found in six colonies from Praslin and La Digue.

The presence of the subspecies *A. m. unicolor* in the archipelago was confirmed by the detection of the sequence A1_Mad3 (KF976994) also described in Madagascar (Rasolofoarivao *et al.*, 2015). To our knowledge, this COI-COII sequence has never been described in other African subspecies and could therefore be considered characteristic of *A. m. unicolor*. This finding corroborated morphological identifications (Ruttner *et al.*, 1993, Cockerell, 1912) and the historical reports (FAO, 1990, Seychelles Departement of Agriculture, 1918) about the presence of *A. m. unicolor* subspecies in the Seychelles archipelago. The two sequences A1_Sey1 and A1_Sey2, highly similar (99%) to A1_Mad3 (Rasolofoarivao *et al.*, submitted) were retrieved on Mahé island. These newly described sequences could also exist in Madagascar (but not having detected), or only occur in Mahé.

The detection of the newly described sequence (O5) Z2_Sey1 brings out evidence of a cryptic introduction from the Z group into La Digue and Praslin. The Z group has been shown to constitute a mitochondrial sub-lineage and a well separated genetic

group (based on microsatellites) inside the African evolutionary branch A (Alburaki *et al.*, 2013, Alburaki *et al.*, 2011). Z2_Sey1 was highly similar (99%) to sequences found in Middle East populations in Syria, Iraq, Lebanon (Alburaki *et al.*, 2011), Saudi Arabia (Alattal *et al.*, 2014) but also in many states of the USA (Magnus *et al.*, 2014, Magnus and Szalanski, 2010). The detection of the Z sequences in the Seychelles colonies could therefore revealed the introduction of *A. m. syriaca* and/or *A. m. jemenitica* colonies. Regarding the referenced importations of honeybee queens from the USA into other islands of the SWIO, such as Rodrigues (Techer *et al.*, 2015b), Z individuals could also be traces from past and non-reported importations from the USA into the archipelago.

Microsatellites results revealed no differences between Z2_Sey2 and A1 colonies cohabiting in Praslin and La Digue, as they were all grouped in the same genetic cluster. This cytoplasmic disequilibrium indicates that Z sub-lineage individuals might be introgressed with *A. m. unicolor* nuclear patrimony. To get at least 99% of nuclear introgression of *A. m. unicolor* genome with constant back-cross, a minimum of eight generations is required. Queen lifetime records varied from 8 years to less than 10 months (Page Jr and Peng, 2001), and the average generation time is usually of two years (Estoup *et al.*, 1995a, Excoffier *et al.*, 2005). So, the introduction could have occurred at least 8 to 16 years ago and consisted of a limited number of Z colonies in the established population.

Concerning referenced importations, no evidence of mtDNA from European lineage and more particularly *A. m. ligustica* (Italian honeybee from the C lineage) were detected in the Seychelles islands. According to microsatellites analyses, the Seychellian colonies belonged to a different genetic group than the Italian colonies according to several population structure analyses (STRUCTURE, INSTRUCT, PCA and DAPC). The characteristic alleles could not be used to detect the presence of the European C lineage (Garnery *et al.*, 1998b) as Madagascar also possessed seven of them (Rasolofoarivao *et al.*, 2015). Some Seychellian colonies presented negligible assignment probabilities to the Italian genetic cluster (INS, K = 4, mean posterior probability = 2.3%) which could probably be more attributable to mis-assignment of the software than very low levels of introgression. Nonetheless, considering the introgression hypothesis, those levels in the overall archipelago population were

even lower than in conserved honeybee populations such as in Sicily for *A. m. siciliana* (min = 5.43%, (Muñoz *et al.*, 2014a)) or in *A. m. mellifera* protected populations in Europe (0-35% of introgression level, (Pinto *et al.*, 2014)). The non-detection of the imported C lineage could result from 1) the extinction of the Europeans colonies due to the tropical environment and/or competition with *A. m. unicolor* colonies and/or 2) to asymmetrical introgression ("Africanization") favoring the African genome due to partial reproductive isolation (Clarke *et al.*, 2002; Kraus *et al.*, 2007) or reproductive advantage of the A lineage (Wallberg *et al.*, 2014). Contrary to the Seychelles archipelago, in Rodrigues, where importations of C lineage had also been reported, honeybee population was only represented by the exotic subspecies *A. m. ligustica* and *A. m. carnica* (Techer *et al.*, 2015b).

Nuclear results show that the genetic diversity of the honeybee population in the Seychelles was high and structured by island and geographical distance. No structuration appeared between sites from a same island indicating that gene flow is sufficient to homogenize the genetic diversity at the intra-island scale. This was corroborated by the results of HWE showing that each island population was considered panmictic and did not suffer from inbreeding. The two detected genetic groups show a distinction between Mahé and Praslin-La Digue populations. This differentiation could result from the ocean barrier length but also from the intensity of exchanges between Praslin and La Digue. Besides, evidence of exchanges between islands were detected with STRUCTURE/INSTRUCT with 1) older exchanges detected from Mahé population in the direction of Praslin and La Digue and 2) earlier gene flow from Praslin-La Digue to Mahé with four individuals showing of recent exchange of colonies and/or queen.

Although evidence of *A. m. unicolor* mtDNA lineage was found widespread and dominant on all islands, nuclear analyses revealed that the Seychellian populations were different from the endemic one in Madagascar. The nuclear genetic differentiation from one of the potential populations of origin could be the consequence of a bottleneck event during colonization/introduction followed by island isolation and gene flow restriction. The divergence between the two populations might also results from past hybridization with other introduced subspecies.

High genetic diversity detected in the archipelago could result from ancient and/or repeated colonization from Madagascar but also from past hybridization. Indeed, it is known that admixture among lineages increase levels of nuclear genetic diversity in honeybee populations (Harpur *et al.*, 2012). Level of genetic diversity was higher in Mahé, the largest island, than in Praslin and La Digue. Hybridization might have been facilitated by the small size of the islands. Yet, in Madeira, another island dominated by the African lineage (2001: n = 50, 98%) and cohabiting with the C one (2%) (Muñoz *et al.*, 2013) levels of genetic diversity were lower than in the Seychelles archipelago (Ar_{2001} = 3.22 ± 1.67, n = 50; $H_{obs2001}$ = 0.388 ± 0.306, n = 33 (Muñoz *et al.*, 2014b)). Same observations were made for others islands such the Canary archipelago and the Azores - São Miguel, in which higher proportion of the mitochondrial introgression of C lineage was observed (Muñoz *et al.*, 2014b, Muñoz *et al.*, 2013). In Madeira, Azores and Canary archipelagos, admixture events have been highlighted with microsatellites (Muñoz *et al.*, 2014b). Therefore, if past importations and potential hybridizations could explain higher genetic diversity in Mahé, inter-archipelago comparison suggests that the overall high genetic diversity in the Seychelles is rather explained by ancient and/or repeated colonization, the absence of *Varroa destructor* and Colony Collapse Disorder symptoms (Seychelles Veterinary Services, personal communication), than only admixture between evolutionary lineages. In order to conclude about the preponderant Malagasy origin of the Seychellian honeybees, further analyses would be needed with a larger sampling. This would help to appreciate the relative contribution of the Malagasy population, coastal populations from East Africa (such as *A. m. litorea*), and of other introduced strains, reported (from Australia, UK) or not (derived populations from Z group, such as *A. m. syriaca* and *jemenitica*).

It has been documented that the honeybee may play a role in pollination of endemic plant such as the coco de mer *Lodoicea maldivica* in Praslin and Curieuse (Blackmore *et al.*, 2012). In Mahé, same observation applies for several native plants in Mahé for which *A. mellifera* provided pollinator services (Kaiser-Bunbury *et al.*, 2011) including the endangered *Medusagyne oppositifolia* (Finger *et al.*, 2011). Such interactions could results from generalist capacities of the honeybee. Yet it is also possible that the honeybee played a crucial role in pollination and contributed to the

maintenance of indigenous plants in the archipelago, well before contemporary scientist observations.

5. Conclusion

In a context of global loss of genetic diversity, it is important to identify honeybee populations and, to conserve as much as possible their original diversity (Meixner *et al.*, 2010, De la Rúa *et al.*, 2013). Increasingly, studies focused on indigenous populations and seek to detect foreign queen importations and levels of introgression with mtDNA and nuclear microsatellites (Pinto *et al.*, 2014, Jensen *et al.*, 2005a, Muñoz and De la Rúa, 2012, Muñoz *et al.*, 2012a, Muñoz *et al.*, 2013, Muñoz *et al.*, 2014b) and more recently with SNP (Muñoz *et al.*, 2014a, Chapman *et al.*, 2015, Muñoz *et al.*, 2015). Based on mtDNA, the honeybee in the Seychelles archipelago is exclusively from maternal African lineage and dominated by the haplotype characteristics of *A. m. unicolor* subspecies. Still, based on nuclear genetic results, the Seychellian honeybee populations were different from *A. m. unicolor* in Madagascar. Ancient colonization associated to island isolation may have led to this divergence. Even on such small islands, high levels of genetic diversity have been detected in the archipelago populations and comparable to other large islands and continental populations. Also, structuration showed that the distance between islands was sufficient to limit gene flow between Mahé and Praslin-La Digue and illustrated the common pattern observed in island systems. MtDNA and microsatellites were valuable tools to characterize the Seychellian honeybee populations and highlight its potential as genetic reservoir that should be protected.

6. Acknowledgements

We would like to thank Margareta, Elvis Nicette, Mark Naiken, Christopher Kaiser and the Seychelles Agricultural Agency for their welcoming and assistance in the collection of samples. We thank also Ronley Franchette from the Department of Environment for the transfer of samples. We are also grateful to the beekeepers for their help and participation in this study, their kindness and generosity: Egbert Mardaye, Alain Toussaint. Paul Perriol, Elsia Michaud, Adam Guy, Paul Richard, Guy Vital, Mickaël Gillie, Alain Jindaro, Ralph Souffe, Steve Payet, Jean Sari and Payet Gérard. We also would like to thank Pierre Franck and Yves Leconte for the Italian samples. We warmly thank the two anonymous reviewers and the editor for their comments and suggestions that greatly improved the manuscript. Maéva A. Techer is recipient of a Ph.D fellowship of the Sciences and Technology Doctoral School of the University of La Réunion. This study was partially funded by CIRAD and the Enlargement and sustainability of the Plant Protection Network (e-PRPV) supported by the European Union, the French government, the Région Réunion and the Département of la Réunion.

Table IV-S3: Allele frequencies at 15 microsatellites *loci* in the three islands honeybee populations of the Seychelles and for the two reference Malagasy and Italian populations (C lineage characteristics alleles defined by Garnery *et al.* (1998b) are indicated by one asterisk; *1pb corresponds to potential characteristic alleles considering one bp of reading difference).

Locus	Allele	Mahé	Praslin	La Digue	Madagascar	Italy
A113	**(bp)**	***n = 72***	***n = 71***	***n = 43***	***n = 107***	***n = 49***
	198		0.021	0.047		
	202		0.007			0.010
	206				0.005	
	208				0.005	0.010
	210	0.718	0.714	0.860	0.433	
	212	0.028	0.007		0.308	
	214*	0.141	0.050		0.250	0.306
	218	0.113	0.200	0.093		0.653
	220					0.020
A24	92	0.070	0.079		0.005	0.235
	94	0.014				
	96	0.077	0.407	0.360	0.206	
	100	0.035	0.029			
	102	0.803	0.486	0.640	0.789	0.510
AP55	175	0.077			0.069	0.051
	177	0.120	0.086	0.023	0.005	0.306
	179	0.007			0.005	0.102
	181	0.676	0.600	0.616	0.916	0.031
	183	0.035	0.264	0.279	0.005	0.112
	185	0.007	0.050	0.081		0.173
	187	0.014				0.051
	189	0.007				0.051
	191					0.010
	193	0.007				0.041
	195					0.010
	197					0.010
	199					0.020
	207	0.049				
	209					0.031
A88	136	0.204	0.014		0.369	
	138			0.012		
	140					0.051
	147	0.085	0.106	0.128	0.248	0.102
	149	0.704	0.880	0.860	0.383	0.806
	151*1pb	0.007				0.031
	152*					0.010
A28	128					0.051
	132	0.162	0.373	0.186	0.122	
	133	0.570	0.345	0.453	0.393	
	134	0.254	0.282	0.302		0.929
	137*1pb	0.014			0.481	
	138*			0.058		0.020
	139				0.005	

Table IV-S3 (following)

Locus A29	Allele (bp)	Mahé *n = 72*	Praslin *n = 71*	La Digue *n = 43*	Madagascar *n = 107*	Italy *n = 49*
	122				0.005	
	126	0.028	0.007		0.015	
	128	0.634	0.754	0.721	0.951	
	129					0.031
	130	0.021			0.029	
	131	0.014				0.031
	132					0.010
	142		0.028	0.012		0.031
	144	0.028	0.014	0.023		0.082
	146	0.099	0.042	0.012		0.061
	148	0.021				0.102
	150	0.007				0.122
	152	0.021				0.122
	154		0.063	0.070		0.071
	156	0.056				0.061
	158	0.014				0.071
	160	0.007	0.035	0.058		0.041
	162	0.042	0.056	0.105		0.041
	164	0.007				0.031
	166					0.020
	168					0.041
	170					0.010
	178					0.010
	180					0.010
AP289	184	0.650	0.578	0.605	0.730	0.908
	186					0.010
	194					0.010
	202					0.020
	206	0.007				
	208					0.031
	212					0.020
	226	0.007			0.005	
	228	0.007	0.007		0.036	
	230	0.100	0.028	0.012	0.087	
	232	0.157	0.225	0.314	0.077	
	234	0.071	0.028		0.051	
	236		0.134	0.070	0.010	
	238				0.005	
AP273	106	0.676	0.817	0.814	0.962	
	108					0.010
	110	0.324	0.183	0.186	0.038	0.980
	112					0.010
(A)B124	212	0.007				0.010
	214				0.005	0.041
	216	0.211	0.183	0.105	0.010	0.694
	218	0.007	0.042			0.173
	220	0.148	0.211	0.140	0.297	0.041
	222				0.010	0.010
	226		0.014		0.015	
	228	0.063	0.134	0.233	0.109	
	230	0.331	0.338	0.384	0.396	0.031
	232	0.232	0.049	0.116	0.119	
	234		0.021		0.040	
	236		0.007	0.023		

Table IV-S3 (following)

Locus	Allele	Mahé	Praslin	La Digue	Madagascar	Italy
A8	**(bp)**	***n* = 72**	***n* = 71**	***n* = 43**	***n* = 107**	***n* = 49**
	165*1pb	0.021	0.035	0.047	0.005	0.125
	169	0.657	0.824	0.767	0.995	
	173	0.014				0.042
	175	0.007	0.007			
	176					0.021
	177	0.042				0.208
	179	0.134	0.134	0.174		0.448
	181	0.127		0.012		0.135
	183	0.127		0.012		0.021
A35	94	0.113	0.099	0.186	0.723	
	107	0.444	0.535	0.593	0.272	
	108				0.005	
	109			0.023		
	110					0.021
	111	0.373	0.352	0.198		0.813
	112					0.010
	113	0.070	0.014			0.135
	117					0.010
	118					0.010
AP33	225	0.014	0.042	0.012		
	227	0.021				0.031
	229					0.041
	231				0.022	0.031
	233	0.214	0.451	0.570	0.543	0.235
	235	0.086	0.042	0.012	0.033	0.153
	237	0.071	0.035	0.151	0.027	0.133
	239	0.200	0.366	0.244	0.212	0.184
	241	0.021	0.007		0.033	0.092
	243	0.029			0.016	0.041
	245	0.014			0.022	0.051
	247	0.014			0.076	0.010
	249	0.314	0.056	0.012	0.016	
AP66	92	0.007				
	94	0.310	0.451	0.233	0.014	0.918
	96				0.066	
	98				0.113	
	100	0.021	0.120	0.151	0.005	0.082
	102	0.415	0.430	0.616	0.797	
	104	0.204			0.005	
	114	0.042				

Table IV-S3 (following)

Locus AP43	Allele (bp)	Mahé *n = 72*	Praslin *n = 71*	La Digue *n = 43*	Madagascar *n = 107*	Italy *n = 49*
	127				0.139	
	129	0.056	0.282	0.186	0.337	
	131				0.005	
	133				0.005	0.082
	137					0.010
	139	0.007				0.071
	141	0.296	0.155	0.174	0.005	0.704
	143*	0.035	0.014			0.041
	147*	0.028	0.070	0.023		0.082
	149	0.007				
	153					0.010
	175				0.005	
	177	0.085	0.035	0.070	0.025	
	179	0.183	0.099	0.116	0.109	
	181	0.176	0.296	0.279	0.163	
	183	0.113	0.049	0.093	0.149	
	185	0.014		0.058	0.045	
	187				0.015	
A43	124	0.028	0.007		-	-
	126*1pb	0.222	0.014	0.081	-	-
	140*1pb	0.451	0.676	0.570	-	-
	142	0.014			-	-
	152	0.285	0.303	0.349	-	-

Colonies exploitées avec des méthodes d'apiculture moderne à La Réunion

V) Chapitre 4 : L'effet île contribue à la différenciation génétique des populations d'*Apis mellifera unicolor* dans les archipels du Sud-Ouest de l'océan Indien***

Maéva Angélique Techer, Johanna Clémencet, Christophe Simiand, Sookar Preeaduth, Lionel Garnery, Bernard Reynaud, Delatte Hélène

Résumé

Les archipels océaniques sont des systèmes privilégiés pour l'étude des processus évolutifs tels l'effet des goulots d'étranglement et la différenciation génétique des populations. Au sein de ces systèmes insulaires, la région du Sud-Ouest de l'océan Indien (SOOI) réunie plusieurs archipels qui offre une variabilité en terme de taille des îles, de leur distance au continent, de leur topographie ainsi que de leur histoire géologique et humaine. Dans ce *hotspot* de biodiversité, l'abeille *A. mellifera* est recensée sur plusieurs îles et, est exploitée pour l'apiculture par l'Homme à Madagascar ainsi que dans les archipels des Mascareignes et des Seychelles. La sous-espèce *A. m. unicolor* a été décrite comme abeille endémique de Madagascar et a été détectée avec l'approche moléculaire dans trois îles de l'archipel des Seychelles. Dans l'archipel des Mascareignes, la diversité génétique de l'abeille à La Réunion et Maurice était très peu connue.

Cette étude a visé à caractériser la diversité génétique nucléaire et mitochondriale de l'abeille à La Réunion et à Maurice, puis de la comparer au *pool* génétique des autres îles du SOOI. D'autre part, la diversité génétique de ces populations insulaires a été comparée à de potentielles populations sources continentales (provenant de 10 pays d'Afrique et 7 pays d'Europe) et insulaires (Madagascar). L'implémentation de ces populations « *outgroup* » a

*** **Ce chapitre est en cours de préparation en vue d'une soumission.**

permis d'estimer leur contribution dans la répartition et structure des populations insulaires observées dans le SOOI.

Une différenciation génétique nucléaire a été observée entre les populations d'*A. m. unicolor* identifiées à La Réunion et Maurice et celles de Madagascar, suivant le même patron observé au Seychelles. D'autre part, les colonies d'abeilles des îles du SOOI se différencient fortement des populations continentales africaines et européennes (excepté pour Rodrigues). D'importantes différences ont été observées dans la proportion des lignées évolutives détectées (A, C et M) dans l'archipel des Mascareignes pouvant être expliquées par des politiques d'importations, des taux de déforestation et des adaptations locales différentes. La cohabitation des trois lignées évolutives à Maurice a conduit à des phénomènes d'hybridation entre lignées et sous-espèces, bien plus récents que ceux observés dans les autres îles du SOOI.

L'archipel des Mascareignes a présenté les plus forts degrés de diversité génétique en comparaison avec les Seychelles et Madagascar (dont le niveau est le plus bas). Ces hauts niveaux de diversité peuvent être expliqués en partie par les hybridations. Toutefois la comparaison de la variabilité génétique nucléaire entre les populations insulaires du SOOI et continentales (Afrique et Europe) a montré que les introductions régulières n'expliquent pas à elles seules la mise en place de la diversité et de la différenciation, mais privilégie plutôt l'hypothèse d'anciennes colonisation naturelles (avant l'arrivée de l'Homme) associées à une réduction des flux de gènes. L'abeille du SOOI offre un excellent exemple du patron évolutif généralement observés dans la diversification insulaire à l'échelle intraspécifique.

Mots-clés : *A. m. unicolor*, île, microsatellite, tropical, structure des populations, lignée africaine

Insularity contributes to genetic differentiation of *Apis mellifera unicolor* populations in the biodiversity hotspot of South West Indian Ocean

Maéva Angélique Techer[1,2], Johanna Clémencet[1], Christophe Simiand[2], Sookar Preeaduth[3], Lionel Garnery[4], Bernard Reynaud[2], Delatte Hélène[2]

[1] Université de La Réunion, UMR PVBMT, F-97715 Saint Denis cedex 9, La Réunion, France

[2] CIRAD, UMR PVBMT, 7 chemin de l'IRAT, Ligne Paradis, 97410 Saint Pierre, La Réunion, France

[3] Ministry of Agro Industry and Food Security, Entomology Division, 80835, Reduit, Mauritius

[4] Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines, 78035 Versailles, France

Abstract

Oceanic archipelagos are privileged systems for the study of evolutionary processes such as bottleneck and population genetic differentiation. Among them, the South West Indian Ocean (SWIO) area gathered several archipelagos with a range of different island sizes, distance to mainland, topography and history (geological and human colonization events). In this hotspot of biodiversity, the honeybee *Apis mellifera* is established and extensively used in beekeeping in Madagascar, Mascarenes and Seychelles archipelagos. *Apis mellifera unicolor* is the subspecies that has been described as the endemic honeybee of Madagascar and genetic evidence of its presence has been recently described in the three main Seychelles islands. On the Mascarenes islands (La Réunion and Mauritius) honeybee genetic diversity had not been assessed.

We characterized the nuclear and mitochondrial diversity of La Réunion and Mauritius honeybees and then compared the genetic variation among islands. In addition, potential continental sources populations (from 10 countries in Africa and 7 countries in Europe) and insular populations (Madagascar) were implemented to estimate the contribution of each continental and insular area into the population structure observed.

As in other SWIO islands, the *A. m. unicolor* populations found in La Réunion and Mauritius differentiated from Madagascar but also from African and European continental populations. Differences were observed in maternal lineages contribution among islands which was possibly linked to importations policies, habitat degradation, and local adaptation. The cohabitation of three lineages in the Mascarenes has led to hybridization between evolutionary linages and subspecies with a more recent event detected in Mauritius than in other SWIO islands. Higher levels of genetic diversity were observed in the Mascarene and Seychelles islands compared to Madagascar probably resulting from introductions and admixture. Nevertheless that high diversity and differentiation from all other compared populations cannot be considered as the result of regular introduction but rather by old colonization (prior Human colonization on those islands) and further reduction of gene flow. The SWIO honeybee populations provided an excellent example of the general pattern of insular diversification.

Keywords: *A. m. unicolor*, island, microsatellite, tropical, population structure, African lineage

1. Introduction

Island archipelagos are considered as model study systems to understand the processes shaping genetic diversity and driving patterns of population differentiation (Warren *et al.*, 2015). Oceanic archipelagos provide a variety of unique islands regarding their geological history, size, distance from mainland, range of habitats and environmental conditions (Whittaker, 1998). The isolation of island by the oceanic barrier limits species colonisation but those with long dispersal capacities such as avian and arthropod fauna are well represented in island communities (Triantis *et al.*, 2015, Gillespie *et al.*, 2012). A general pattern has been observed in islands systems with insular populations characterized by low genetic diversity possibly resulting from i) founder effect and bottleneck, ii) low population size and iii) geographical isolation (Frankham, 1997). In addition to the reduction of gene flow, genetic changes can accumulate in insular populations due to local adaptation in response of environment pressures or randomly by genetic drift (non-adaptive). These evolutionary processes contribute to the genetic differentiation between insular and continental populations and promote allopatric speciation. The divergence does not imply an absence of gene flow and can occur with migration (symmetric or not) between populations (Sousa and Hey, 2013). Consequently, oceanic islands are renowned for their exceptional biodiversity and high rate of endemism (Myers *et al.*, 2000, Triantis *et al.*, 2015, Kier *et al.*, 2009). However, these ecosystems are also threatened by anthropogenic actions such as deforestation and introduction of exotic species.

In the South West Indian Ocean (SWIO), Madagascar plus the Seychelles and Mascarene archipelagos have been classified as hotspot of biodiversity (Myers *et al.*, 2000, Mittermeier *et al.*, 2011). In this area, several arthropods have colonised the archipelagos from Madagascar and Africa without resulting in detectable adaptive radiation but showing population differentiation (Kuntner and Agnarsson, 2011, Casquet *et al.*, 2015). In the regional fauna, the honeybee *A. mellifera* is present on almost all SWIO islands. This species have been spread worldwide by human for beekeeping but is naturally distributed in Africa, Europe and Middle East (Ruttner, 1988). Microtaxonomy of the honeybee described several "geographical" subspecies

using morphometric and/or molecular markers, but the exact number is still ambiguous (27 to 30) (Engel, 1999, Meixner *et al.*, 2011, Sheppard and Meixner, 2003, Kandemir *et al.*, 2011, Ilyasov *et al.*, 2011, Wang *et al.*, 2012, Ruttner, 1988). They were clustered into four evolutionary branches which have been supported by further molecular analyses (Garnery *et al.*, 1992, Wallberg *et al.*, 2014, Whitfield *et al.*, 2006). These four groups have been recognized as evolutionary lineages comprising the African A lineage (including the Z sub-group (Alburaki *et al.*, 2013) and the Yemenite Y sub-group (Franck *et al.*, 2001)), the European M and C lineages and the Oriental O lineage. Among the recognized subspecies *A. m. unicolor* has been described endemic to Madagascar and belongs to the African lineage (Ruttner, 1988). Studies have shown that the genome of *A. m. unicolor* (n = 2) clearly differentiated from other African subspecies (Whitfield *et al.*, 2006, Han *et al.*, 2012). A recent population genetic study, at the scale of the island (n = 867 from 76 sites) using mtDNA and microsatellites confirmed this observation (Rasolofoarivao *et al.*, 2015) and also revealed that two genetic groups occurred according to geographical localisation. Low genetic diversity was detected probably resulting from a bottleneck event in which Africa was the source population.

Molecular tools have been developed in order to detect and discriminate the evolutionary lineages and subspecies. The polymorphism of the COI-COII mtDNA intergenic region has been shown to be a powerful marker to identified evolutionary lineages and maternal sub-lineages in honeybee populations (Garnery *et al.*, 1993, Cornuet and Garnery, 1991, Meixner *et al.*, 2013). Lately, genetic evidence of the Malagasy honeybee lineage has been found in the Seychelles archipelago (around 1 100 km North to Madagascar) but was associated with population differentiation (14 microsatellites) (Techer *et al.*, 2015a, Rasolofoarivao *et al.*, 2015). Nevertheless, this pattern was not commonly observed in all SWIO islands as the honeybee population from Rodrigues (Mascarene archipelago between 900 to 1 500 km East of Madagascar) was characterized by the exclusive presence of exotic European lineage (Techer *et al.*, 2015b). For the two others islands of the Mascarenes, honeybee populations have been poorly studied but similar COI-COII PCR-RFLP pattern as Madagascar has been found on few samples (La Réunion, n = 20 and Mauritius, n = 10) (Franck *et al.*, 2001). For both islands the presence of honeybee before human is

debated (Hermann, 1920, Cheke, 2010) but several importations have been recorded (Ayme, 2014, Bappoo and Ramanah, 1989) and could have led to hybridization. The lack of knowledge on origin and demography of *A. mellifera* in the SWIO archipelagos have led many studies to considered the honeybee as introduced, raising concerns about its interactions with the highly endemic flora (Le Péchon *et al.*, 2013, Pailler and Thompson, 1997, Meeus *et al.*, 2011, Hansen *et al.*, 2002) and fauna by an exceptional case of kleptoparasitism with an endemic gecko (Clémencet *et al.*, 2013).

For that reason, this study proposes i) to assess the genetic diversity of the honeybee in the two remaining islands of the Mascarene archipelago (La Réunion and Mauritius) by determining the evolutionary lineages present using mtDNA COI-COII PCR-RFLP and evaluate levels of genetic diversity using 14 microsatellites; then ii) to identify potential hybridization event and effect on genetic diversity in the SWIO and finally iii) to compare the SWIO insular populations with native continental ones to better apprehend the contribution of Africa and Europe in the genetic population structure pattern.

2. Materials and Methods

2.1. Honeybee populations sampling

Sampling was carried both on the South West Indian Ocean (SWIO) islands (Madagascar, Mascarene and Seychelles archipelago) and on native continental areas (Africa and Europe). A total of 4231 samples from 347 worldwide sites were sampled, including 1457 samples from already published datasets from Rasolofoarivao *et al.* (2015) and Techer *et al.* (2015a, 2015b) (Table V-1). Within each site, one worker honeybee per hive was collected at the entrance or inside of each colony, then killed by immersion in 95% ethanol and stored at – 20°C until laboratory processing.

	Site code	Nb. of beekeepers	Sampling date	*n*	Source
South West Indian Ocean islands					
La Réunion	REU001-127	67	Nov. 2011- Nov. 2012	**2050**	
Mauritius	MUS01-24	15	2012	**346**	
	MUS25-31	6	2014	**21**	
Rodrigues	ROD01-20	16	2013	**524**	a
Madagascar	MDG01-76		2011-2013	**748**	b
	MDG77	1	2013	**12**	
	MDG78		1996	**26**	c
	MDG79		1998	**1**	c
	MDG80		1997	**12**	c
	MDG81		1997	**56**	c
Mahé	SYC01-17	10	2013	**71**	d
	SYC33-37	5	2015	**10**	
Praslin	SYC18-30	3	2013	**71**	d
	SYC38-40	3	2015	**8**	
La Digue	SYC31-32	2	2013	**43**	d
	SYC41-43	3	2015	**6**	
African populations					
Egypt	EGY01		1997	**2**	c
Senegal	SEN01	1	2015	**2**	
São Tomé Island	STP01		1998	**12**	c
Chad	TCD01	1	2015	**1**	
	TCD02	1	2015	**3**	
Central African Republic	CAF01	1	2013	**3**	
	CAF02	1	2013	**2**	
	CAF03	1	2015	**1**	
	CAF04	1	2015	**3**	
	CAF05	1	2015	**2**	
Gabon	GAB01	1	2014	**1**	
	GAB02	1	2014	**2**	
Uganda	UGA01	1	2015	**1**	
Malawi	MWI01		1995	**3**	c
	MWI02		1995	**1**	c
	MWI03		1995	**2**	c
	MWI04		1995	**2**	c
Zimbabwe	ZWE01		1995	**5**	c
	ZWE02	1	2014	**9**	
South Africa	ZAF01	1	2013	**25**	
	ZAF02		2015	**2**	
	ZAF03		2015	**4**	
European populations					
Portugal	PRT01		2013	**1**	
	PRT02		2013	**1**	
	PRT03		2013	**1**	
	PRT04		2013	**1**	
	PRT05		2013	**1**	
	PRT06	1	2013	**8**	
Spain	ESP01		2013	**3**	
France	FRA01	1	2013	**15**	
	FRA02	1	2013	**20**	
	FRA03	1	2013	**13**	
Switzerland	CHE01	1	2013	**3**	
Germany	DEU01		1998	**6**	c
	DEU02	1	2013	**3**	
Italy	ITA01	1	1997	**27**	c
	ITA02	1	1997	**5**	c
	ITA03	1	1997	**7**	c
	ITA04	1	1997	**11**	c
	ITA05	1	1997	**1**	c
	ITA06	1	1997	**2**	c
	ITA07	1	1997	**2**	c
	ITA08	1	1997	**1**	c
Greece	GRC01	1	2015	**6**	
				4231	

🡸 **Table V-1 :** Sampling location details for the islands of the South West Indian Ocean, African and European populations. Table details site identification code (corresponding to Fig. 1, S1, S2 and S3), number of beekeepers, and date of the sampling, *n*: the number of honeybee colonies sampled; and the reference source of some samples integrated in this survey.
a : from Techer *et al.* (2015a)
b : from Rasolofoarivao et al. (2015)
c : from Franck (1999)
d : from Techer *et al.* (2015b)

2.1.1. Sampling in the SWOI islands

The South West Indian Ocean (SWIO) region includes the continental island of Madagascar (587 040 km²) which lies at 400 km in the East of Africa; the Mascarene archipelago located at 900 to 1500 km at the East of Madagascar and the granitic Seychelles archipelago located more than 1 100 km in the North of Madagascar. The Mascarene archipelago is of volcanic origin and is constituted of three islands: La Réunion (2 512 km²), Mauritius (1 865 km²) and the far remote island Rodrigues (104 km²). La Réunion has the highest altitude of the SWIO with the non-active volcano (Piton des Neiges) which culminate at 3 070 m. The Seychelles archipelago groups 115 islands of volcanic and granitic which size varies from less than 0.1 km² to 156 km². In this archipelago we focused on the three main granitic islands already described in Techer *et al.* (2015a) : Mahé, Praslin and La Digue which offers a wider range of habitats than smallest islands.

For the Mascarene archipelago, 2050 honeybee colonies were sampled from 127 sites of La Réunion (from 67 beekeepers and three feral colonies) between November 2011 to November 2012 (Table V-1, Figure V-1 and V-S1). In order to be representative of the overall population, samples were collected in different habitats from lowlands (less than 5 m REU117) to highlands (over 1 000 m), circuses (Salazie site code REU121-123, Cilaos REU124-126), in a landlocked place (Grand Bassin REU127), in the National Park encompassing several sites and from urban areas to original tropical forest (Mare longue REU036-37). Only three wild colonies in La Réunion were sampled and were hard to find and/or reach besides feral swarming is often practice by beekeepers.

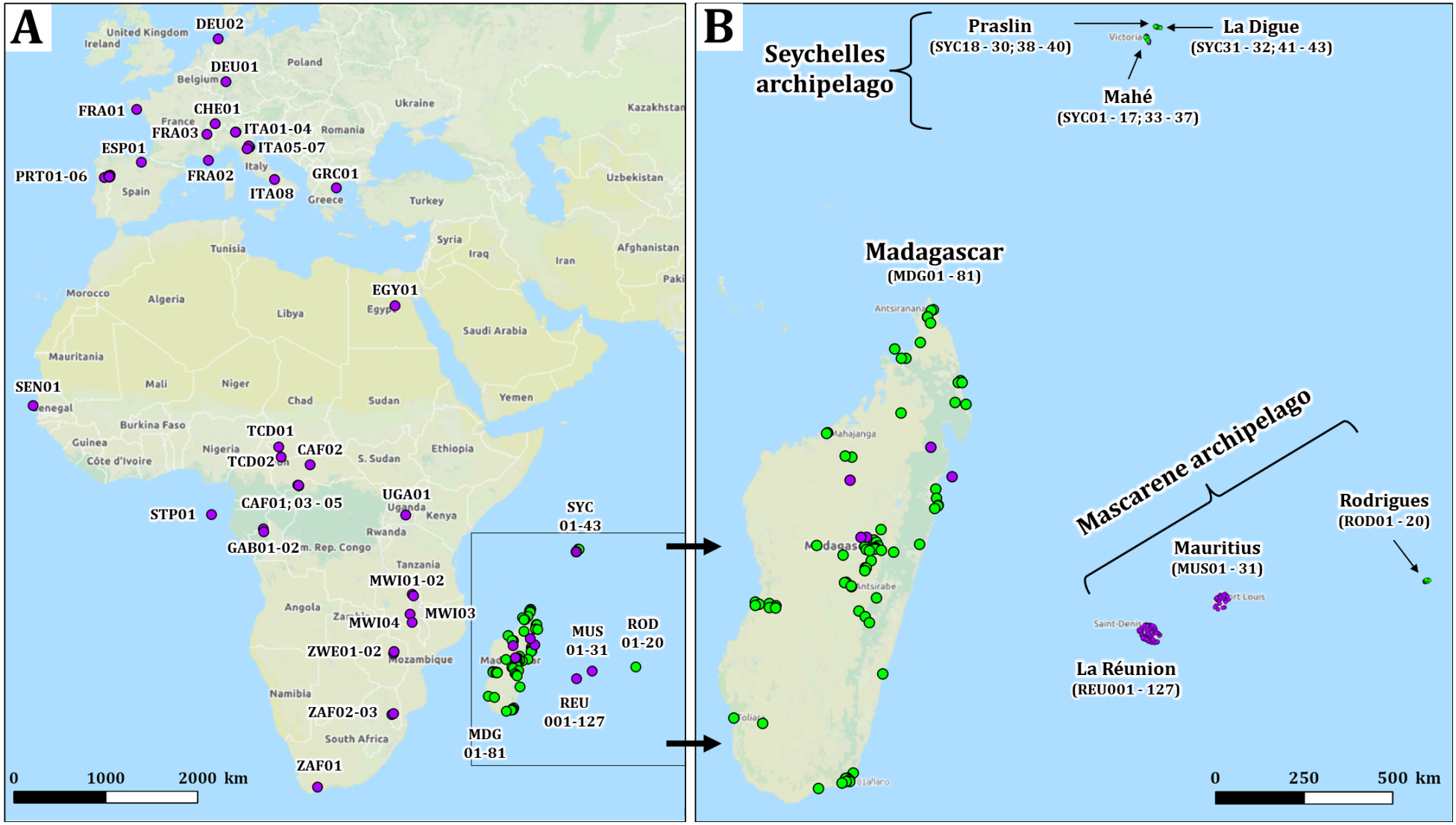


Figure V-1 : A) Geographical distribution of the honeybee sampling sites in Africa, Europe and islands of the South West Indian Ocean (SWIO). B) Geographical disposition and localisation of the Mascarene and Seychelles archipelago with respect to Madagascar. Location of samples are represented by circle: purple ones indicate sampling sites from this study and green ones indicate sampling sites already described from Rasolofoarivao et al. 2015, and Techer et al. 2015a; 2015b. Layer used for the map is OpenStreetMap.

According to last identification by sanitary organization, 13 000 managed colonies were identified on La Réunion (GDS, 2014), so sampling represents at least 15.8% of the reported colonies. Concerning Mauritius, 367 colonies were collected from 31 sites (from 21 beekeepers and one feral colony) in November 2012 and September 2014 (Table V-1, Figure V-1 and V-S1). As in La Réunion, sampling covered the entire island from urban areas to forests, such as from Black River Gorges National Park (MUS01 and MUS28). Sampling in Mauritius represented 13.6% of the identified population (2700 reported colonies; (Jhumun, 2011). Concerning Rodrigues, all the 524 colonies sampled from Techer *et al.* (2015b) were included in this study.

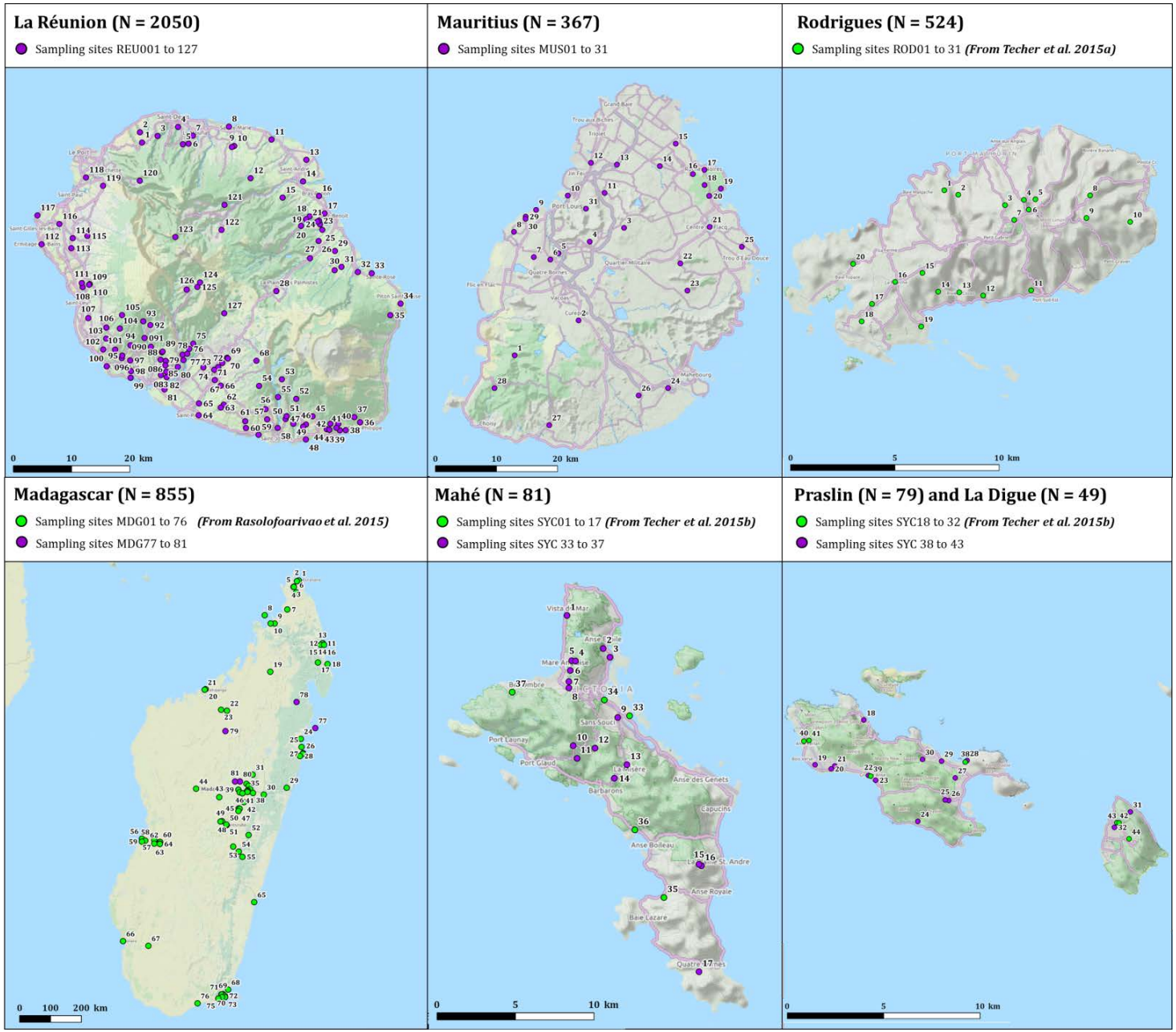
For the Seychelles archipelago, 209 samples were collected from 43 sites in the three main islands: Mahé, Praslin and La Digue (Table V-1, Figure V-1 and V-S1). Samples data already collected from Techer *et al.* (2015a) (n = 185) were included in this study (Table V-1 and Figure V-S1). In addition, 24 colonies were newly collected from 11 apiaries from 11 new beekeepers that had never been sampled (April 2015).

For Madagascar, 748 samples already available from Rasolofoarivao *et al.* (2015) were used and 12 supplementary colonies were collected from Sainte Marie Island in 2013 (MDG77). Furthermore, 95 samples from four sites (MDG 78-81) collected by P. Franck between 1996 and 1998 were also implemented in the study (Table V-1, Figure V-1 and V-S1).

2.1.2. Sampling in Africa and Europe

In Africa, a total of 88 individuals from 22 sites were collected in 10 African countries (see Table V-1 for details and Figure V-1). Sampling sites covered different African habitats and several subspecies natural range: *A. m. adansoni*, *A. m. lamarckii*, *A.m. scutellata*, *A. m. capensis*, *A. m. monticola*, *A. m. litorea*.

In Europe, 138 individuals were sampled from 22 sites in seven countries (Table V-1 and Figure V-S1). Sampling range encompassed geographical native areas of *A. m. iberiensis*, *A. m. mellifera*, *A. m. carnica*, *A. m. ligustica* and *A. m. cecropia* subspecies with various habitats.


La Réunion (N = 2050)
Sampling sites REU001 to 127
Mauritius (N = 367)
Sampling sites MUS01 to 31
Rodrigues (N = 524)
Sampling sites ROD01 to 31 (From Techer et al. 2015a)
Madagascar (N = 855)
Sampling sites MDG01 to 76 (From Rasolofoarivao et al. 2015)
Sampling sites MDG77 to 81
Mahé (N = 81)
Sampling sites SYC01 to 17 (From Techer et al. 2015b)
Sampling sites SYC 33 to 37
Praslin (N = 79) and La Digue (N = 49)
Sampling sites SYC18 to 32 (From Techer et al. 2015b)
Sampling sites SYC 38 to 43
0 10 20 km
0 10 20 km
0 5 10 km
0 100 200 km
0 5 10 km
0 5 10 km

🡸 **Figure V-S1 :** *First line and from left to right*: Geographical positions of the 127 sampling sites from La Réunion, 31 from Mauritius, and 20 from Rodrigues in the Mascarene archipelago. *Second line and from left to right*: Geographical positions of the 81 sampling sites from Madagascar, 43 sites in the Seychelles archipelago with 22 sites from Mahé, 16 from Praslin 5 sites from La Digue. Each purple circle indicate one sampling site and green circles inform about sampling sites already described from Rasolofoarivao et al. 2015, and Techer et al. 2015a; 2015b. N = Number of honeybee colonies sampled by island. Layer used for the map is OpenStreetMap.

2.2. DNA extraction and mitochondrial COI-COII analysis

One worker per colony was used to analyse both mitochondrial markers. Total DNA was extracted from the six legs for SWIO honeybees and one leg for collection samples. Legs were incubated in 400µL of extract buffer containing 0.1 M Tris HCl (pH 8.0), 80 mM EDTA, 100 mM NaCl, 200 mM sucrose, 2% SDS, 0.1 mg/ml proteinase K and H_2O, overnight at 37° C. Then extracts were centrifuged for 20 sec at 12 000 rpm then 50µl potassium acetate 8M was added, followed by a centrifugation for 20 min at 12 000 rpm. DNA was ethanol precipitated at ambient temperature, pelleted (30 min at 12 000 rpm), rinsed in 95% ethanol, vacuum dried, and resuspended in 100 µL of Tris HCl 10mM and EDTA 1mM. DNA was then assayed by spectrophotometry (Nanodrop V8000) and diluted to 5 ng per µl for following analyses.

Mitochondrial analysis was carried out on the intergenic COI-COII region through the PCR-RFLP *DraI* (Garnery et al., 1993). E2 and H2 primers (Garnery et al., 1992) were used to amplified COI-COII intergenic region as described in Garnery et al. (1993). Successively, enzymatic digestion with DraI on PCR amplicons was performed in 15µL according manufacturer recommendation (*Promega*). Restriction fragments were run on 4% agarose gel. All different restriction profiles obtained were sent for sequencing to Macrogen©. Sequences were manually checked and aligned using Mega 5.1 software (Tamura et al., 2011). All mitochondrial COI-COII sequences were blasted on NCBI GenBank and newly described ones were submitted to the database.

2.3. Microsatellite analysis

All DNA samples were amplified using multiplex PCR reactions with 14 microsatellite loci: A113, A24, AP55, A88, A28, A29, AP289, AP273, (A)B124, A8, A35, AP33, AP66, and AP43 (Estoup et al., 1994; Estoup et al., 1995; Franck et al., 1998; Solignac et al., 2003). Multiplex composition, PCR reactions and genotypes scoring followed the same method as described in Techer *et al.* (2015b).

2.4. Population genetic analysis

An individual was considered as successfully genotyped when at least 65% of multilocus genotyping was successful. Potential genotyping reading errors were checked using MICRO-CHECKER 2.2.3 (Van Oosterhout *et al.*, 2004a). Population unit was considered at two levels, in the study, either at the scale of the sites (n = 347), or at the scale of the islands or countries (n = 24). Null allele frequency per locus (A_{null}) was estimated for each population unit with FREENA (Chapuis and Estoup, 2007). Nuclear genetic diversity indices such as mean number of alleles (N_{all}), observed (H_{obs}), unbiased expected heterozygosity (H_{nb}) and F_{IS} per population unit (with n ≥ 5) were estimated using GENETIX 4.05 (Belkhir *et al.*, 1996). HP-RARE (Kalinowski, 2005) was used to compute allelic richness using rarefaction method per island or country level (only for population with n ≥ 6). Population unit pairwise F_{ST} were estimated using FSTAT 2.9.3.2 software (Goudet, 2001b). Genetic distance between island and continental populations (country) was estimated using DA distance (Nei *et al.*, 1983) and was represented on a neighbour-joining tree computed with 1000 bootstraps replicates using POPULATIONS 1.2.32 software (Langella, 2002). GENEPOP 3.4 was used to test deviation from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) and genetic differentiation between population pairs (Raymond and Rousset, 2004).

The genetic structure among populations was further assessed using STRUCTURE 2.3.3 (Pritchard *et al.*, 2000), INSTRUCT software (Gao *et al.*, 2007) and DAPC methods (Jombart et al., 2010). INSTRUCT was used as it is considered robust when inferring genetic structure in populations with signs of inbreeding and does not require the *prior* assumption of HWE within clusters. A total of 10^6 simulations using 10^5 burn-in steps and MCMC (Markov Chain Monte Carlo algorithm) steps

were run for all samples (n = 4231) simultaneously, considering a K interval [1-25] with 10 iterations each. Optimal number of clusters was estimated using ΔK method described by Evanno *et al.* (2005). Subsequent runs were computed to evaluated intra-island structure considering separately La Réunion samples (n = 2050), Mauritius one (n = 367) and continental populations samples (n = 226) but for K [1-20]. STRUCTURE HARVESTER online (Earl and vonHoldt, 2011), CLUMPP (Jakobsson and Rosenberg, 2007) was used to average the best run for each K and DISTRUCT 1.1 (Rosenberg, 2004) was used to reconstruct the graphical outputs.

Discriminant Analysis of Principal Components (DAPC) (Ramasamy *et al.*, 2014) was also used to investigate genetic structure and/or differentiation between populations, using R 3.0.2 software (Team, 2005) and adegenet 1.3 - 9.2 package (Jombart, 2008). With this method, the optimal number of cluster is estimated by computation of the BIC (Bayesian Information Criterion) value but can also be evaluate with a step-by-step method. Assignment probabilities can also be represented in barplot for each K with the function *compoplot*. Using the same R package, Principal Components Analysis (PCA) was run in order to represent graphically the genetic diversity and differentiation among individuals without making structure assumption.

3. Results

3.1. Mitochondrial diversity

3.1.1. Structure of the COI-COII intergenic region

Amplification of the COI-COII intergenic region was successful for 4096 colonies out of the 4231 analysed colonies (96.8%). Eight PCR product lengths were observed (Table V-2 and V-3), corresponding to the previously described amplicon types: Q (19.0%, n = 779) characteristic of the European C lineage; P_0Q (77.0%, n = 3154) and P_0QQ (2.0%, n = 81) characteristics of the tropical African A lineage; P_1QQ (0.2%, n = 10) and P_1QQQ (0.1%, n = 3) characteristics of the Atlantic African A lineage; and PQ (0.3%, n = 12), (Franck *et al.*, 2001, Garnery *et al.*, 1993).

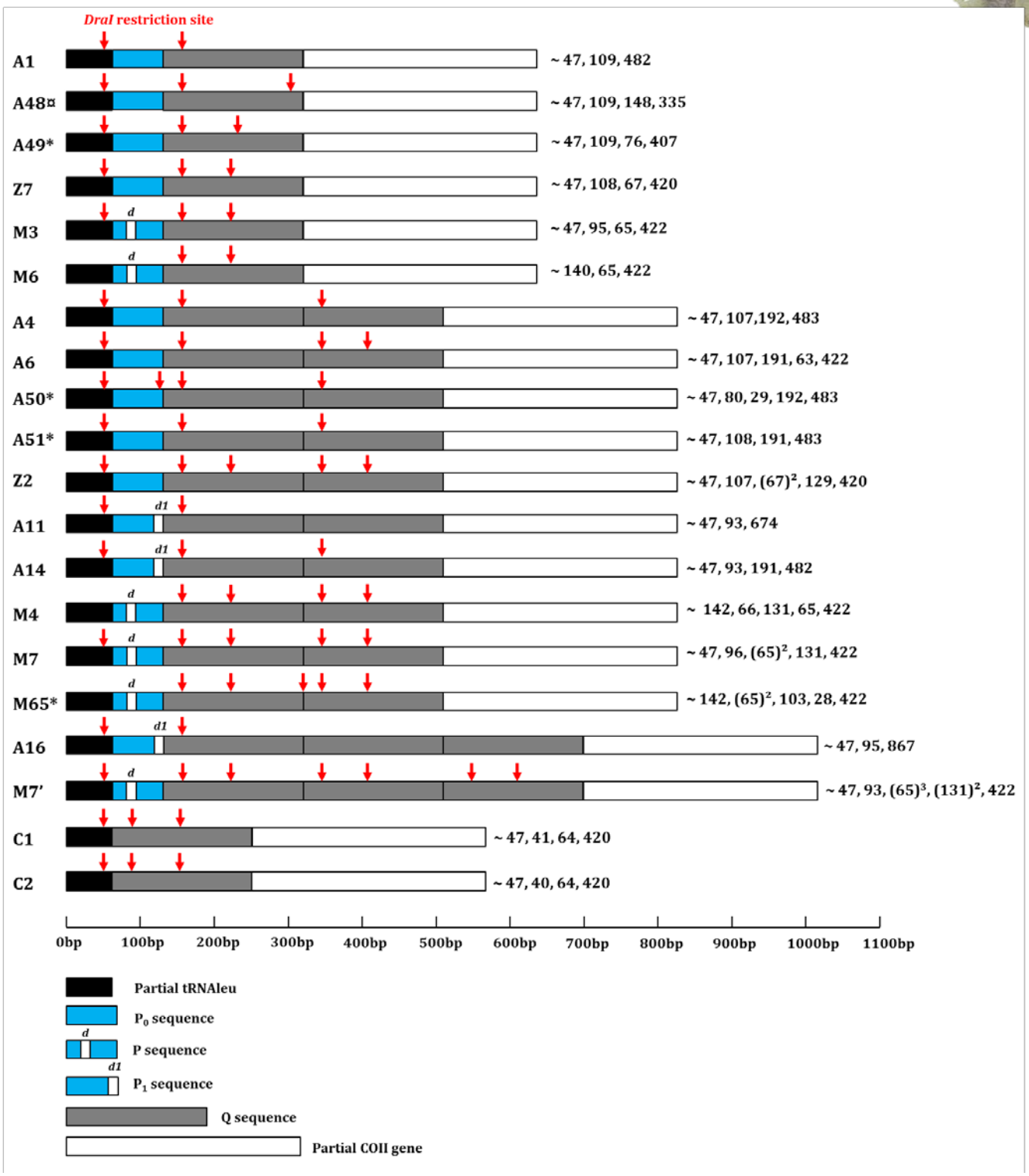


Figure V-2 : Restriction maps corresponding to the 19 *DraI* restriction patterns observed on agarose gel and confirmed by sequencing of the COI-COII intergenic region. C1 and C2 patterns were not distinguishable on gel (one mutation) and were coded as C1/C2. For each restriction pattern, composition in P (P_0, P or P_1) and Q unit (from one to three units observed) is indicated. "*d*" and "*d1*" are characteristic deletions of the M lineage and Atlantic A lineage, respectively. Restriction sites are indicated by red arrows, number and restriction fragments size are also presented (~ indicates that size could slightly varied from a few bp due to insertion/deletion not affecting restriction sites).

¤ Renamed restriction pattern previously described as A1_Mad13 (KF977004).

* New restriction pattern described in this study.

3.1.2. COI-COII restriction profiles pattern

After *DraI* digestion of the eight COI-COII amplicon types, 19 restriction profiles were detected on gel including five new restriction profile descriptions: A48, A49, A50, A51 and M65 (Figure V-2), names are according to Garnery *et al.* (1993) nomenclature. Three African sub-lineages defined by Franck *et al.* (2001) were found in 3225 colonies for A_I (A1, A4, A6, A48, A49, A50 and A51), in 13 colonies for A_{III} (A11, A14, A16) and in 10 colonies for Z one (Z2 and A7). Identification of the restriction profiles was confirmed with sequencing of one individual per profile.

Within the African lineage (A_I, A_{III} and Z sub-lineages), the digestion of P_0Q amplicon revealed four restriction patterns: A1 (n = 3149, 76.88%), A48 was previously described by Rasolofoarivao *et al.* (2015) but renamed regarding the PCR-RFLP nomenclature (n = 2, 0.05%), A49 (n = 1, 0.02%), and Z7 (n = 2) (see restriction map in Figure V-2 and Table V-2, V-3). Digestion of P_0QQ amplicon revealed five restriction profiles: A4 (n = 69, 1.68%), A6 (n = 1), A50 (n = 2), A51 (n = 1) and Z2 (n = 8, 0.20%). Digestion of P_1QQ amplicon gave two restriction profiles: A11 (n = 9, 0.22%) and A14 (n = 1) whereas P_1QQQ type corresponded to only one restriction pattern: A16 (n = 3, 0.07%).

For the European M lineage, the digestion of PQ revealed two profiles: M3 (n = 6, 0.15%) and M6 (n = 6). Digestion of PQQ gave three restriction profiles corresponding to M4 (n = 25, 0.61%), M7 (n = 23, 0.56%) and to a newly described ones: M65 (n = 3) (see restriction map in Figure V-2). The PQQQ amplicon type revealed only one profile: M7′ (n = 6) which has the same profile as M7 but with one supplementary Q unit.

For the European C lineage, only one restriction profile was observed on gel after the digestion that we named here C1/C2. Agarose gel resolution did not allow observing the one bp insertion/deletion mutation between the two restriction patterns but sufficient to detect presence of the C lineage (Figure V-2 and Table V-2, V-3). Sequencing of two individuals from the profile C1/C2 confirmed the presence of both C1 and C2 in the samples.

Table V-2 : Mitochondrial COI-COII intergenic region diversity (based on the 19 *DraI* restriction profiles observed) and nuclear diversity indices for each of SWIO, African and European sites. *n*: number of colony per site; N_{all}: mean number of alleles; H_{nb} and H_{obs}: unbiased expected and observed heterozygosity, respectively; F_{IS} and A_{null}: mean allele null frequency.

		PoQ				PoQQ					P1QQ		P1QQQ	PQ		PQQ			PQQQ	Q					
	n	**A1**	**A48**	**A49**	**Z7**	**A4**	**A6**	**A50**	**A51**	**Z2**	**A11**	**A14**	**A16**	**M3**	**M6**	**M4**	**M65**	**M7**	**M7'**	**C1/C2**	N_{all}	H_{nb}	H_{obs}	F_{IS}	A_{null}
La Réunion																									
REU001	**3**	3																			-	-	-	-	-
REU002	**14**	14																			5.36	0.679	0.679	0.001	0.032
REU003	**10**	8																			5.36	0.689	0.742	-0.082	0.009
REU004	**1**	1																			-	-	-	-	-
REU005	**32**	32																			7.14	0.645	0.649	-0.006	0.009
REU006	**1**	1																			-	-	-	-	-
REU007	**1**	1																			-	-	-	-	-
REU008	**1**	1																			-	-	-	-	-
REU009	**1**	1																			-	-	-	-	-
REU010	**1**	1																			-	-	-	-	-
REU011	**42**	33																		9	7.00	0.648	0.656	-0.011	0.009
REU012	**2**	2																			-	-	-	-	-
REU013	**29**	29																			6.00	0.618	0.594	0.038	0.025
REU014	**38**	38																			7.21	0.655	0.618	0.058*	0.022
REU015	**5**	5																			3.86	0.664	0.614	0.083	0.019
REU016	**9**	9																			4.71	0.694	0.699	-0.007	0.010
REU017	**5**	5																			3.29	0.549	0.543	0.013	0.038
REU018	**1**	1																			-	-	-	-	-
REU019	**31**	31																			6.29	0.672	0.631	0.063	0.028
REU020	**30**	30																			7.07	0.676	0.653	0.036	0.020
REU021	**63**	63																			8.07	0.665	0.669	-0.005*	0.014
REU022	**4**	4																			-	-	-	-	-
REU023	**21**	20																		1	7.43	0.680	0.700	-0.030	0.012
REU024	**8**	8																			4.79	0.644	0.622	0.036	0.010
REU025	**27**	23																		4	6.71	0.678	0.667	0.017	0.013
REU026	**4**	4																			-	-	-	-	-
REU027	**4**	4																			-	-	-	-	-
REU028	**1**	1																			-	-	-	-	-
REU029	**29**	25																			6.07	0.659	0.663	-0.006	0.016
REU030	**20**	20																			5.36	0.634	0.668	-0.055	0.006
REU031	**20**	20																			6.86	0.698	0.704	-0.008	0.011
REU032	**99**	96														1				2	9.50	0.667	0.682	-0.023	0.006
REU033	**21**	20																		1	6.57	0.677	0.661	0.025*	0.022
REU034	**34**	28																		4	7.71	0.694	0.674	0.028*	0.022
REU035	**24**	22																		2	6.64	0.670	0.660	0.016*	0.021
REU036	**23**	23																			6.93	0.682	0.723	-0.062	0.005
REU037	**1**																			1	-	-	-	-	-
REU038	**5**	4																		1	3.43	0.624	0.569	0.096*	0.033
REU039	**74**	71																		3	8.07	0.663	0.667	-0.006	0.008
REU040	**7**	5														2					4.50	0.656	0.655	0.002	0.002
REU041	**37**	35																		2	7.50	0.659	0.632	0.041*	0.020

Table V-2 (following part 2/5)

		PoQ				PoQQ					P1QQ		P1QQQ	PQ		PQQ			PQQQ	Q					
	n	A1	A48	A49	Z7	A4	A6	A50	A51	Z2	A11	A14	A16	M3	M6	M4	M65	M7	M7'	C1/C2	N_{all}	H_{nb}	H_{obs}	F_{IS}	A_{null}
REU042	**55**	55																			8.07	0.690	0.708	-0.026*	0.004
REU043	**50**	39																		11	8.00	0.678	0.674	0.005	0.010
REU044	**3**	3																			-	-	-	-	-
REU045	**5**	5																			3.79	0.684	0.750	-0.111*	0.003
REU046	**25**	20														1				4	6.93	0.692	0.734	-0.062	0.007
REU047	**9**	8																			5.07	0.686	0.698	-0.020	0.018
REU048	**6**	6																			4.14	0.672	0.700	-0.046	0.009
REU049	**20**	20																			6.86	0.693	0.688	0.006	0.014
REU050	**1**	1																			-	-	-	-	-
REU051	**3**	2				1															-	-	-	-	-
REU052	**18**	16														1				1	6.00	0.682	0.680	0.004	0.024
REU053	**80**	71																		8	9.07	0.677	0.652	0.038*	0.019
REU054	**2**	2																			-	-	-	-	-
REU055	**20**	20																			6.86	0.711	0.703	0.012	0.015
REU056	**41**	38				2														1	8.29	0.682	0.673	0.014	0.009
REU057	**9**	9																			4.79	0.642	0.682	-0.067	0.000
REU058	**3**	3																			-	-	-	-	-
REU059	**11**	11																			4.93	0.646	0.675	-0.048	0.019
REU060	**13**	11																		1	6.07	0.662	0.648	0.022	0.011
REU061	**1**	1																			-	-	-	-	-
REU062	**2**	2																			-	-	-	-	-
REU063	**5**	5																			3.93	0.654	0.643	0.019	0.024
REU064	**6**	5																			4.36	0.687	0.625	0.098	0.037
REU065	**9**	9																			4.64	0.657	0.651	0.010	0.015
REU066	**4**	4																			-	-	-	-	-
REU067	**1**																			1	-	-	-	-	-
REU068	**3**	2																			-	-	-	-	-
REU069	**7**	7																			4.64	0.678	0.651	0.042	0.006
REU070	**24**	19																			7.50	0.705	0.691	0.020	0.022
REU071	**10**	10																			4.93	0.676	0.700	-0.037	0.011
REU072	**21**	19																			6.57	0.708	0.739	-0.044	0.003
REU073	**2**	2																			-	-	-	-	-
REU074	**2**	2																			-	-	-	-	-
REU075	**3**	3																			-	-	-	-	-
REU076	**21**	14																		2	7.21	0.701	0.735	-0.049	0.009
REU077	**6**	6																			4.71	0.702	0.655	0.074	0.037
REU078	**1**	1																			-	-	-	-	-
REU079	**10**	10																			5.29	0.686	0.674	0.019	0.030
REU080	**20**	18																		1	7.00	0.695	0.683	0.019	0.022
REU081	**6**	6																			4.79	0.711	0.702	0.013	0.016
REU082	**20**	20																			6.86	0.684	0.638	0.069*	0.031
REU083	**1**	1																			-	-	-	-	-
REU084	**1**	1																			-	-	-	-	-
REU085	**15**	12																		2	6.07	0.684	0.637	0.070*	0.027
REU086	**40**	40																			8.14	0.682	0.644	0.056*	0.024
REU087	**20**	18																			6.86	0.683	0.648	0.051*	0.024
REU088	**27**	24																		1	7.29	0.697	0.685	0.017*	0.018
REU089	**24**	13																		6	7.14	0.700	0.718	-0.026	0.008

Table V-2 (following part 3/5)

		PoQ				PoQQ					P1QQ		P1QQQ	PQ		PQQ			PQQQ	Q					
	n	A1	A48	A49	Z7	A4	A6	A50	A51	Z2	A11	A14	A16	M3	M6	M4	M65	M7	M7'	C1/C2	N_{all}	H_{nb}	H_{obs}	F_{IS}	A_{null}
REU090	**20**	16				2															6.21	0.682	0.679	0.004	0.013
REU091	**27**	23																		4	6.93	0.674	0.641	0.050*	0.026
REU092	**20**	17																			6.50	0.687	0.697	-0.016	0.014
REU093	**31**	27																		2	7.43	0.693	0.677	0.023	0.018
REU094	**15**	15																			5.36	0.656	0.650	0.009	0.017
REU095	**2**	2																			-	-	-	-	-
REU096	**11**	7																		4	5.43	0.687	0.675	0.017	0.022
REU097	**9**	9																			4.71	0.681	0.610	0.110	0.035
REU098	**1**	1																			-	-	-	-	-
REU099	**22**	13																		1	6.79	0.671	0.636	0.053	0.021
REU100	**50**	50																			8.71	0.688	0.695	-0.010	0.006
REU101	**2**	2																			-	-	-	-	-
REU102	**68**	66																		2	8.64	0.659	0.646	0.019	0.011
REU103	**6**	6																			4.07	0.637	0.662	-0.042	0.010
REU104	**5**	5																			3.79	0.628	0.536	0.160*	0.030
REU105	**1**	1																			-	-	-	-	-
REU106	**1**	1																			-	-	-	-	-
REU107	**2**	2																			-	-	-	-	-
REU108	**22**	9																			6.64	0.692	0.659	0.049*	0.030
REU109	**29**	29																			7.07	0.681	0.643	0.056*	0.022
REU110	**13**	13																			5.36	0.653	0.673	-0.031	0.010
REU111	**2**	2																			-	-	-	-	-
REU112	**16**	16																			5.50	0.634	0.612	0.036	0.020
REU113	**10**	10																			4.50	0.615	0.589	0.046*	0.033
REU114	**2**	2																			-	-	-	-	-
REU115	**5**	5																			3.57	0.635	0.643	-0.014	0.022
REU116	**17**	15																		1	6.14	0.663	0.662	0.001	0.020
REU117	**1**	1																			-	-	-	-	-
REU118	**10**	10																			4.71	0.638	0.637	0.003	0.016
REU119	**7**	7																			4.00	0.641	0.643	-0.003	0.019
REU120	**14**	13																			5.86	0.675	0.671	0.007	0.010
REU121	**1**	1																			-	-	-	-	-
REU122	**7**	7																			3.71	0.650	0.668	-0.031	0.022
REU123	**3**	2																			-	-	-	-	-
REU124	**40**	40																			8.00	0.693	0.672	0.030	0.018
REU125	**5**	5																			3.93	0.689	0.643	0.075	0.032
REU126	**60**	58																			8.29	0.684	0.662	0.032*	0.022
REU127	**24**	22																		2	6.36	0.695	0.728	-0.049	0.002
Mauritius																									
MUS01	**1**																			1	-	-	-	-	-
MUS02	**20**	19				1															3.79	0.391	0.414	-0.060	0.008
MUS03	**1**																			1	-	-	-	-	-
MUS04	**16**	15		1																	4.36	0.441	0.420	0.050	0.016
MUS05	**3**	1																		2	2.86	0.567	0.619	-0.118	0.000
MUS06	**10**	10																			2.71	0.358	0.357	0.003	0.011
MUS07	**13**	12																		1	4.07	0.450	0.445	0.012	0.009

Table V-2 (following part 4/5)

		PoQ				PoQQ					P1QQ		P1QQQ	PQ		PQQ			PQQQ	Q				
	n	A1	A48	A49	Z7	A4	A6	A50	A51	Z2	A11	A14	A16	M3	M6	M4	M65	M7	M7'	C1/C2	N_{all}	H_{nb}	H_{obs}	F_{IS}	A_{null}
MUS08	**22**	18																2		2	5.79	0.538	0.513	0.048*	0.033
MUS09	**29**	11																2		16	6.64	0.632	0.613	0.029*	0.020
MUS10	**1**	1																			-	-	-	-	-
MUS11	**2**	2																			-	-	-	-	-
MUS12	**23**	22																		1	4.86	0.406	0.385	0.053	0.009
MUS13	**4**	1																		3	-	-	-	-	-
MUS14	**1**	1																			-	-	-	-	-
MUS15	**8**	4																		4	2.79	0.396	0.402	-0.016	0.019
MUS16	**14**	14																			4.00	0.413	0.408	0.012	0.010
MUS17	**14**	12				1														1	5.00	0.525	0.500	0.050	0.028
MUS18	**28**	27																		1	5.79	0.466	0.466	-0.001	0.011
MUS19	**19**	4																		15	5.50	0.612	0.623	-0.019	0.019
MUS20	**93**																			93	8.79	0.691	0.719	-0.040	0.008
MUS21	**20**	1																		19	7.00	0.680	0.754	-0.111*	0.002
MUS22	**1**	1																			-	-	-	-	-
MUS23	**1**	1																			-	-	-	-	-
MUS24	**2**	2																			-	-	-	-	-
MUS25	**4**	4																			-	-	-	-	-
MUS26	**5**	3																		2	3.07	0.357	0.357	0.059	0.031
MUS27	**1**	1																			-	-	-	-	-
MUS28	**4**	4																			-	-	-	-	-
MUS29	**1**	1																			-	-	-	-	-
MUS30	**2**	1																		1	-	-	-	-	-
MUS31	**4**	3																		1	-	-	-	-	-
Mahé (2015)																									
SYC33	**2**	2																			-	-	-	-	-
SYC34	**3**	3																			-	-	-	-	-
SYC35	**1**	1																			-	-	-	-	-
SYC36	**2**	2																			-	-	-	-	-
SYC37	**2**	2																			-	-	-	-	-
Praslin (2015)																									
SYC38	**2**	2																			-	-	-	-	-
SYC39	**3**	3																			-	-	-	-	-
SYC40	**2**	1								1											-	-	-	-	-
SYC41	**1**									1											-	-	-	-	-
La Digue (2015)																									
SYC42	**3**	3																			-	-	-	-	-
SYC43	**1**	1																			-	-	-	-	-
SYC44	**2**	2																			-	-	-	-	-
Madagascar																									
MDG77	**12**	12																			2.86	0.400	0.393	0.018	0.017
MDG78	**26**	26																			4.29	0.466	0.448	0.041*	0.031
MDG79	**1**	1																			-	-	-	-	-
MDG80	**12**	12																			3.79	0.463	0.488	-0.057	0.014
MDG81	**56**	56																			4.93	0.435	0.434	0.004	0.009

Table V-2 (following part 5/5)

		PoQ				PoQQ					P1QQ		P1QQQ	PQ		PQQ			PQQQ	Q				
	n	A1	A48	A49	Z7	A4	A6	A50	A51	Z2	A11	A14	A16	M3	M6	M4	M65	M7	M7'	C1/C2	N_{all}	H_{nb}	H_{obs}	F_{IS}	A_{null}
Africa																									
EGY01	**2**				2																-	-	-	-	-
SEN01	**2**					2															-	-	-	-	-
STP01	**12**					10		1													4.79	0.653	0.693	-0.063	0.014
TCD01	**1**						1														-	-	-	-	-
TCD02	**3**					2															-	-	-	-	-
CAF01	**3**	2				1															-	-	-	-	-
CAF02	**2**	1				1															-	-	-	-	-
CAF03	**1**					1															-	-	-	-	-
CAF04	**3**	2				1															-	-	-	-	-
CAF05	**2**	1				1															-	-	-	-	-
GAB01	**1**	1																			-	-	-	-	-
GAB02	**2**	1				1															-	-	-	-	-
UGA01	**1**								1												-	-	-	-	-
MWI01	**3**																				-	-	-	-	-
MWI02	**1**	1																			-	-	-	-	-
MWI03	**2**	2																			-	-	-	-	-
MWI04	**2**	1																			-	-	-	-	-
ZWE01	**5**					5															6.07	0.856	0.800	0.072	0.022
ZWE02	**9**					9															8.43	0.870	0.831	0.047	0.017
ZAF01	**25**	1				21		1													12.43	0.862	0.832	0.036	0.014
ZAF02	**2**					1															-	-	-	-	-
ZAF03	**4**	1				3															-	-	-	-	-
Europe																									
PRT01	**1**												1								-	-	-	-	-
PRT02	**1**												1								-	-	-	-	-
PRT03	**1**										1										-	-	-	-	-
PRT04	**1**										1										-	-	-	-	-
PRT05	**1**											1									-	-	-	-	-
PRT06	**8**	2									5		1								3.64	0.445	0.500	-0.133*	0.000
ESP01	**3**										2								1		-	-	-	-	-
FRA01	**15**															10	3			2	5.43	0.510	0.480	0.062	0.023
FRA02	**20**														6	10			4		5.86	0.607	0.589	0.031*	0.028
FRA03	**13**																			13	6.43	0.704	0.752	-0.072	0.017
CHE01	**3**																			2	-	-	-	-	-
DEU01	**6**																			6	3.64	0.579	0.548	0.059	0.026
DEU02	**3**																			3	-	-	-	-	-
ITA01	**27**																	15	1	11	6.21	0.479	0.508	-0.062*	0.000
ITA02	**5**													3				1		1	3.29	0.465	0.457	0.019	0.014
ITA03	**7**													2				2		3	3.93	0.506	0.520	-0.030	0.016
ITA04	**11**													1						10	3.93	0.440	0.390	0.120*	0.034
ITA05	**1**																			1	-	-	-	-	-
ITA06	**2**																			2	-	-	-	-	-
ITA07	**2**																			2	-	-	-	-	-
ITA08	**1**																	1			-	-	-	-	-
GRC01	**6**																			6	3.21	0.462	0.452	0.023	0.027

3.1.3. Distribution of mtDNA evolutionary lineages

In the SWIO islands, eight restriction profiles were detected belonging to the African A_I and Z sub-lineages and European M and C lineages (Table V-2 and V-3). Madagascar samples had only African profiles with a dominance of A1 profile (99.4%, n = 850) and then in low frequencies A48 and A4. All samples from MDG77 to MDG81 presented A1 profile (Table V-3). Concerning Seychelles islands, restriction profiles detected in the 24 individuals sampled in 2015 were identical to 2013 samples, with 22 colonies having A1 profile and 2 colonies Z2 pattern. As already observed in Techer *et al.* (2015a), Z sub-lineage was only found in Praslin and La Digue (Table V-3).

For the Mascarene archipelago, the three mtDNA lineages A, C and M were detected but in different proportions. La Réunion was dominated by the African lineage with 95.2% of the colonies having A1 profile and 0.3% with A4 profile; then C lineage was far behind with 4.3% of the colonies with C1/C2 profile, and 0.3% of the remaining colonies showed the M4 profile, characteristic of the M lineage. A1 profile was distributed in 125 sites out of the 127 sampled in La Réunion, while C1/C2 profile was detected on 30 sites distributed all over the island (Table V-3).

For Mauritius, A lineage was detected in 54.2% of the sampled colonies, followed by 44.7% of C lineage and 1.1% of M lineage (Table V-2). Sites MUS20 and 21 (two apiaries from a unique beekeeper) contributed for 68.3% (n = 112) of the C presence in Mauritius (Table V-3). A1 and C1/C2 profiles were distributed all over Mauritius in 28 and 17 sites out of the 31, respectively. All Rodrigues colonies had C1/C2 profile as described in Techer *et al.* (2015b).

Profiles A48 (Madagascar, n = 2) and A49 (Mauritius, n = 1) were solely detected in the SWIO islands.

African populations exhibited restriction patterns characteristics of the A lineage (A1, A4, A6, A50, A51 and Z7). Profiles A4 (74.7%, n = 59) and A1 (17.7%, n = 14) were the dominant ones in the African samples (Table V-2 and V-3).

Table V-3 : Mitochondrial COI-COII intergenic region diversity (based on the 19 *DraI* restriction profiles observed, N = 4096) and nuclear diversity indices for each of SWIO islands, African and European countries (all colonies pooled in one population). *n*: number of sampled and successfully genotyped colony; N_{all}: mean number of alleles; Ar_6: allelic richness (based on 6 diploid individuals); H_{obs}: observed heterozygosity; and A_{null}: mean allele null frequency.

		PoQ				PoQQ					P1QQ		P1QQQ	PQ		PQQ			PQQQ	Q				
	n	A1	A48	A49	Z7	A4	A6	A50	A51	Z2	A11	A14	A16	M3	M6	M4	M65	M7	M7'	C1/C2	N_{all}	Ar_6	H_{obs}	A_{null}
SOOI islands:																								
La Réunion	2050	1886				5										5				85	16.21	4.34	0.667	0.010
Mauritius	367	196		1		2												4		164	10.57	3.87	0.550	0.021
Rodrigues	524																			468	7.64	4.14	0.648	0.015
Mahé	81	81																			7.00	3.67	0.572	0.014
Praslin	79	75								4											5.57	3.22	0.554	0.014
La Digue	49	45								4											5.00	3.14	0.510	0.001
Madagascar	855	850	2			3															9.57	2.82	0.414	0.022
Africa:																								
Egypt	2				2																-	-	-	-
Senegal	2					2															-	-	-	-
Sao Tome	12					10		1													4.79	3.95	0.693	0.014
Chad	4					2	1														-	-	-	-
CAF	11	6				5															9.64	7.10	0.864	0.021
Gabon	3	2				1															-	-	-	-
Uganda	1								1												-	-	-	-
Malawi	8	4																			7.57	6.76	0.830	0.018
Zimbabwe	14					14															10.29	6.96	0.820	0.029
South Africa	31	2				25		1													13.14	6.93	0.823	0.021
Europe:																								
Portugal	13	2									7	1	3								5.07	3.78	0.517	0.003
Spain	3										2								1		-	-	-	-
France	48														6	20	3		4	15	9.36	4.83	0.601	0.046
Switzerland	3																			2	-	-	-	-
Germany	9																			9	4.14	3.62	0.516	0.031
Italy	56													6				19	1	30	7.21	3.56	0.475	0.001
Greece	6																			6	3.21	3.21	0.452	0.019
Total	**4231**	**3149**	**2**	**1**	**2**	**69**	**1**	**2**	**1**	**8**	**9**	**1**	**3**	**6**	**6**	**25**	**3**	**23**	**6**	**779**				

The two newly described restriction profiles A50 and A51 were rare within the current sampling, with n = 2 (São Tomé and South Africa) and n = 1 (Uganda) respectively. South Africa was the country population showing the highest mtDNA variability among the sampled African populations with three different PCR-RFLP profiles: A1, A4 and A50.

Most European populations exhibited only typical C and M profiles already described in these native populations at the exception of Iberian Peninsula also presenting African profiles. A total of 43.8% of colonies showed M profiles, 45.3% had C profile, 9.5 % with A_{III} profiles (Spain and Portugal) and 1.5% with A_{I} profile (Portugal). Details for each site and country are given in table V-2 and V-3.

3.2. Nuclear genetic diversity in the SWIO

All samples (n = 4231) were considered as successfully genotyped with less than 60% of missing data. Preliminary analysis showed negligible null alleles frequencies for all populations with less than 4.6% (Table V-3). La Réunion and Mauritius sampling was representative of the overall genetic diversity as an asymptotic relationship was observed between cumulative number of sampled colonies and mean number of alleles per locus (Figure V-S2) (Pons and Chaouche, 1995).

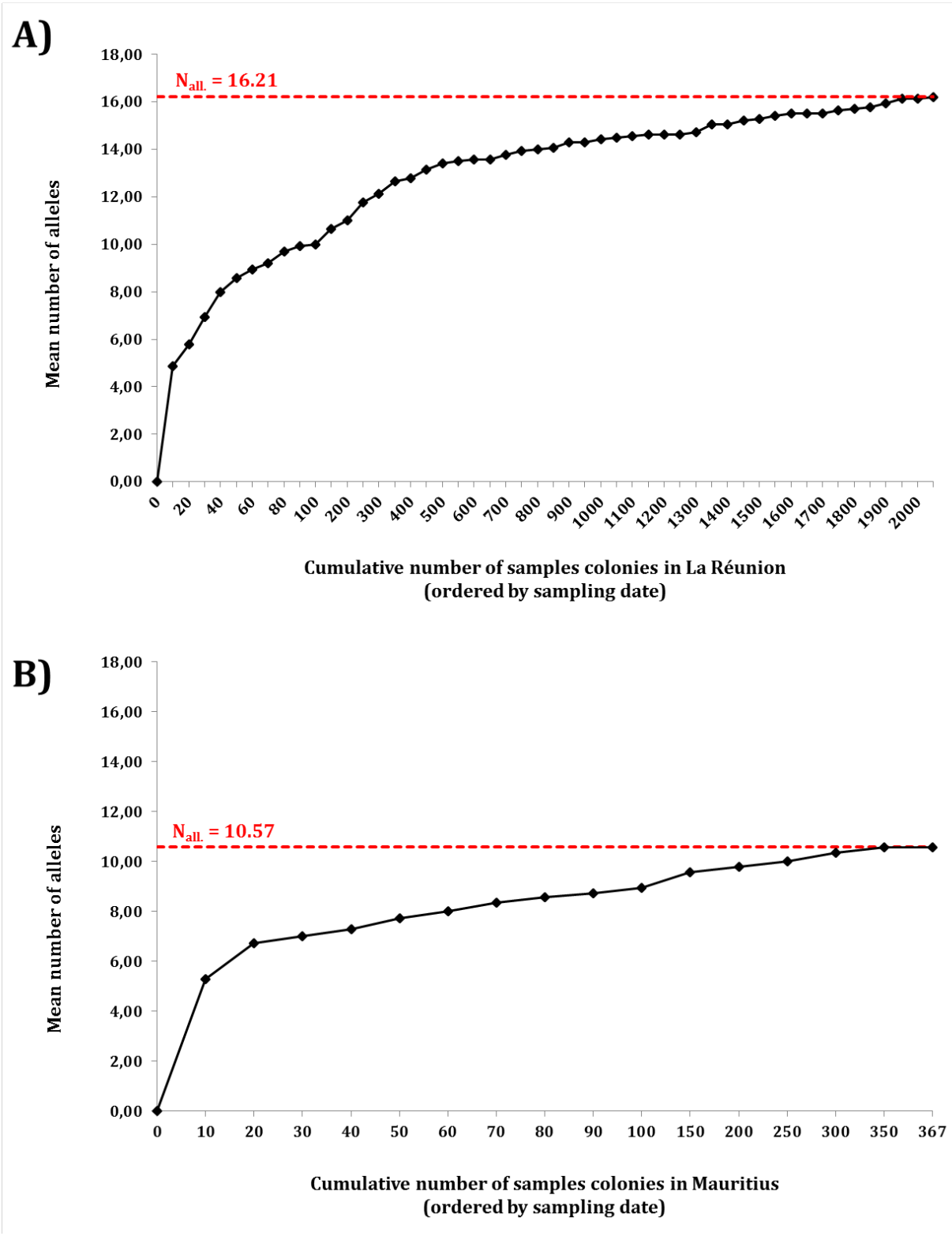


Figure V-S2 : Sampling effort represented by the cumulative number of colonies sampled (ordered by sampling date) and mean number of alleles per locus for 14 microsatellites *loci* (± standard deviations) in La Réunion (A) and Mauritius (B).

La Réunion exhibited the highest allelic richness value (Ar_6 = 4.34) compared to other islands in the SWIO area while Madagascar showed the lowest one (Ar_6 = 2.82) (Table V-3). The most diverse continental populations were from Africa with Central African Republic (Ar_6 = 7.10), Zimbabwe (Ar_6 = 6.96), South Africa (Ar_6 = 6.93) and Malawi (Ar_6 = 6.76). The highest observed heterozygosity was also detected in in African populations ranging from 65.3% (Sao Tome) to 87.4% (CAF) and the lowest one was observed in Madagascar with only 43.8% of heterozygotes. La Réunion (66.7%) and Mauritius (64.8%) had heterozygotes frequencies comparable to continental populations.

F_{IS} ranged from -0.082 to 0.110 for La Réunion sites and from -0.118 to 0.059 for Mauritius ones (Table V-2). Only 21 sites over the 127 for La Réunion and 3 over the 31 for Mauritius showed significant departures from HW equilibrium. When considering islands or countries as population units, significant disequilibrium were detected for La Réunion (F_{IS} = 0.015), Mauritius (F_{IS} = 0.067), Madagascar (F_{IS} = 0.055), Zimbabwe (F_{IS} = 0.056), South Africa (F_{IS} = 0.015), France (F_{IS} = 0.126) and Germany (F_{IS} = 0.107).

3.3. Population genetic differentiation

3.3.1. F_{ST} analysis and Da distance

In La Réunion, pairwise F_{ST} values between sites ranged from 0.004 to 0.034 and 48 pairs out of 3655 (considering N ≥ 5) were significant (P < 0.000368). 25 of those pairs involved two sites located in a circus (REU 124 and 126) with other sites from all over the island nevertheless F_{ST} values were relatively low.

In Mauritius, pairwise F_{ST} values between sites ranged from -0.058 to 0.166, and 25 pairs out of the 120 were significant and 19 of them involved MUS20 and 21 (two apiaries from the same beekeeper) paired with other apiaries (P < 0.000476) (Table V-S1).

Concerning continental populations, no significant genetic differentiation was observed i) between sites sequentially sampled in Zimbabwe (10 years apart)

Table V-4 : F_{ST} pair values among SOOI islands, African and European countries populations with N ≥ 5 based on 14 microsatellites. All tests were significant (after Bonferroni corrections with P < 0.000368) except the ones indicated in **bold**. REU: La Réunion, MUS: Mauritius, ROD: Rodrigues, MAH: Mahé, PRA: Praslin, DIG: La Digue, MDG: Madagascar, STP: São Tomé, CAF: Central African Republic, MWI: Malawi, ZWE: Zimbabwe, ZAF: South Africa, PRT: Portugal, FRA: France, DEU: Germany, ITA: Italy and GRC: Greece.

	REU	**MUS**	**ROD**	**MAH**	**PRA**	**DIG**	**MDG**	**STP**	**CAF**	**MWI**	**ZWE**	**ZAF**	**PRT**	**FRA**	**DEU**	**ITA**
MUS	0.043															
ROD	0.111	0.192														
MAH	0.041	0.035	0.181													
PRA	0.068	0.050	0.203	0.053												
DIG	0.075	0.041	0.229	0.048	0.015											
MDG	0.144	0.108	0.361	0.158	0.162	0.139										
STP	0.267	0.333	0.288	0.341	0.361	0.375	0.456									
CAF	0.158	0.222	0.192	0.225	0.250	0.258	0.331	0.117								
MWI	0.191	0.255	0.201	0.258	0.288	0.299	0.387	**0.112**	**0.018**							
ZWE	0.164	0.225	0.203	0.224	0.251	0.259	0.341	0.132	**0.007**	**0.014**						
ZAF	0.160	0.217	0.184	0.216	0.237	0.242	0.337	0.122	**0.011**	**0.018**	**0.006**					
PRT	0.333	0.377	0.304	0.407	0.424	0.445	0.516	0.342	0.245	0.241	0.224	0.198				
FRA	0.207	0.259	0.176	0.274	0.296	0.310	0.417	0.231	0.152	0.140	0.141	0.118	0.080			
DEU	0.134	0.267	0.068	0.243	0.285	0.324	0.459	0.327	0.199	**0.228**	0.197	0.184	0.401	0.213		
ITA	0.174	0.305	0.084	0.286	0.325	0.362	0.491	0.420	0.322	0.349	0.325	0.293	0.471	0.300	0.055	
GRC	0.175	0.316	0.139	0.282	0.339	0.367	0.486	**0.366**	0.233	**0.270**	0.240	0.220	0.506	0.306	**0.105**	0.148

and ii) between geographical distant sites in Italia. The only exception was for the three sites in France for which the site FRA03 (100% C lineage) was significantly differentiated from the two other (FRA01 with 86.7% and FRA02 with 100% of M lineage) (Table V-S2).

At the island/country population level (all sites from an island or country pooled together), 125 population pairs over the 136 were significantly differentiated ($P < 0.000368$) (Table V-4). The lowest F_{ST} value was observed between Zimbabwe and South Africa ($F_{ST} = 0.006$) and the highest between Madagascar and Portugal ($F_{ST} = 0.516$).

All island population pairs from the SWIO were significantly differentiated however with lower values between La Réunion-Mauritius-Seychelles (F_{ST} ranged from 0.015 to 0.075) (Table V-4). All islands were significantly differentiated from African and European country populations (Table V-4). However, F_{ST} values were generally higher between Madagascar and continental populations (0.331 to 0.516) than compared to other SWIO islands and continental populations (0.068 to 0.445).

Inside the African continent, studied populations did not significantly differed from each other except for São Tome insular population which was significantly different from all other African populations ($F_{ST} = 0.112$ to 0.132). On the contrary, almost all pairs of European populations showed significant genetic differentiation especially between Portugal and Germany-Italy-Greece countries ($F_{ST} = 0.401$ to 0.506) (Table V-4).

Differentiation among insular and continentals populations was confirmed by genetic distance calculated with method from Nei *et al.* (1983) and can be visualized on figure V-3.

3.3.2. PCA analysis and genetic differentiation

PCA graphical analysis confirmed the genetic differentiation among SWIO islands and more particularly between Rodrigues and Madagascar (Figure V-4A). La Réunion was also clearly differentiated from Madagascar and Rodrigues. Scatter points from La Réunion, Mauritius and the Seychelles islands were overlapping indicating a nuclear proximity. Samples from Mauritius showed a high genetic variability between colonies, with points spreading along the first axis with

individuals closely related to Rodrigues colonies and other sharing genetic identity with Madagascar (Figure V-4A). Global PCA, implementing African and European samples, confirmed the high genetic differentiation between SWIO islands and continental populations (Figure V-4B). Scatters from European samples (in particular Italy, Germany, Switzerland and Greece) overlapped with Rodrigues scatter indicating a nuclear proximity. African samples showed the highest genetic variability with individuals spreading all along the axis 2 (Figure V-4B). One important point was that Madagascar individuals (100% A lineage) were clearly differentiated from African populations as well as it the case of La Réunion and Mauritius.

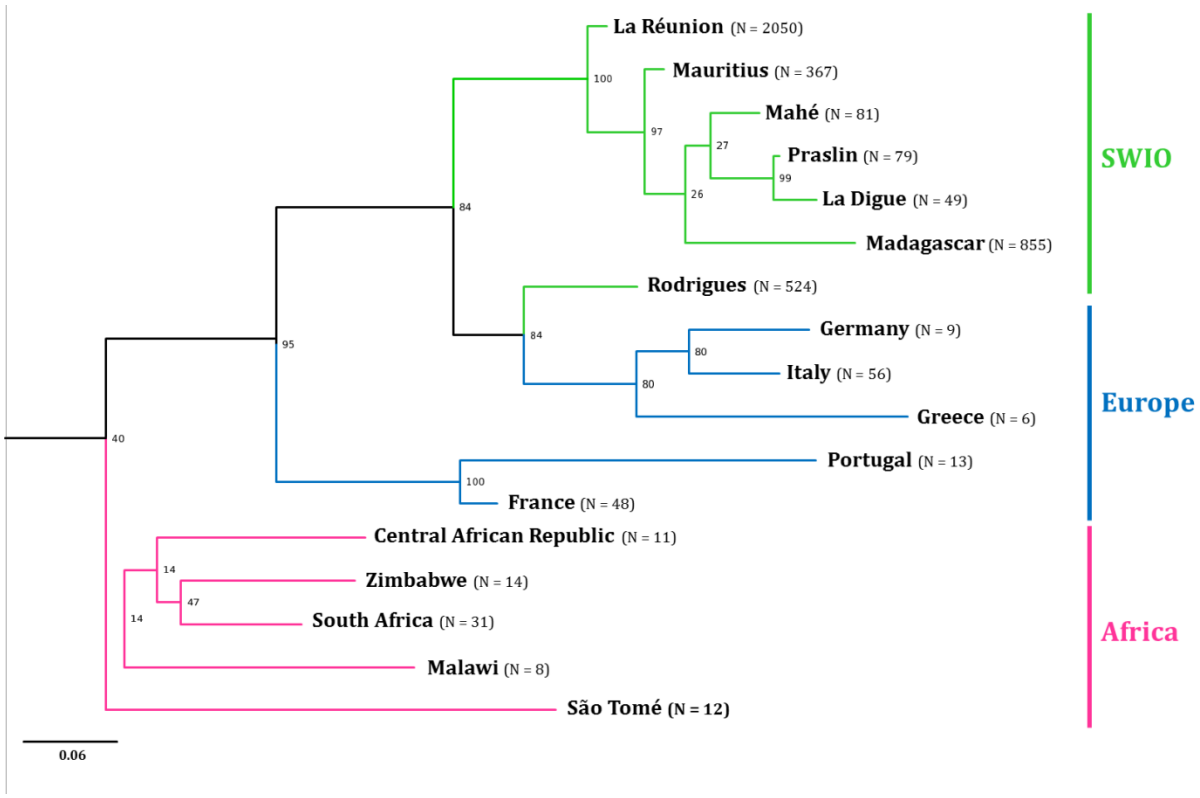


Figure V-3 : Neighbour-joining tree using Nei's distance (1983) and computed from 14 *loci* microsatellite data of the sampled SWIO islands, African and European countries (with N ≥ 5).

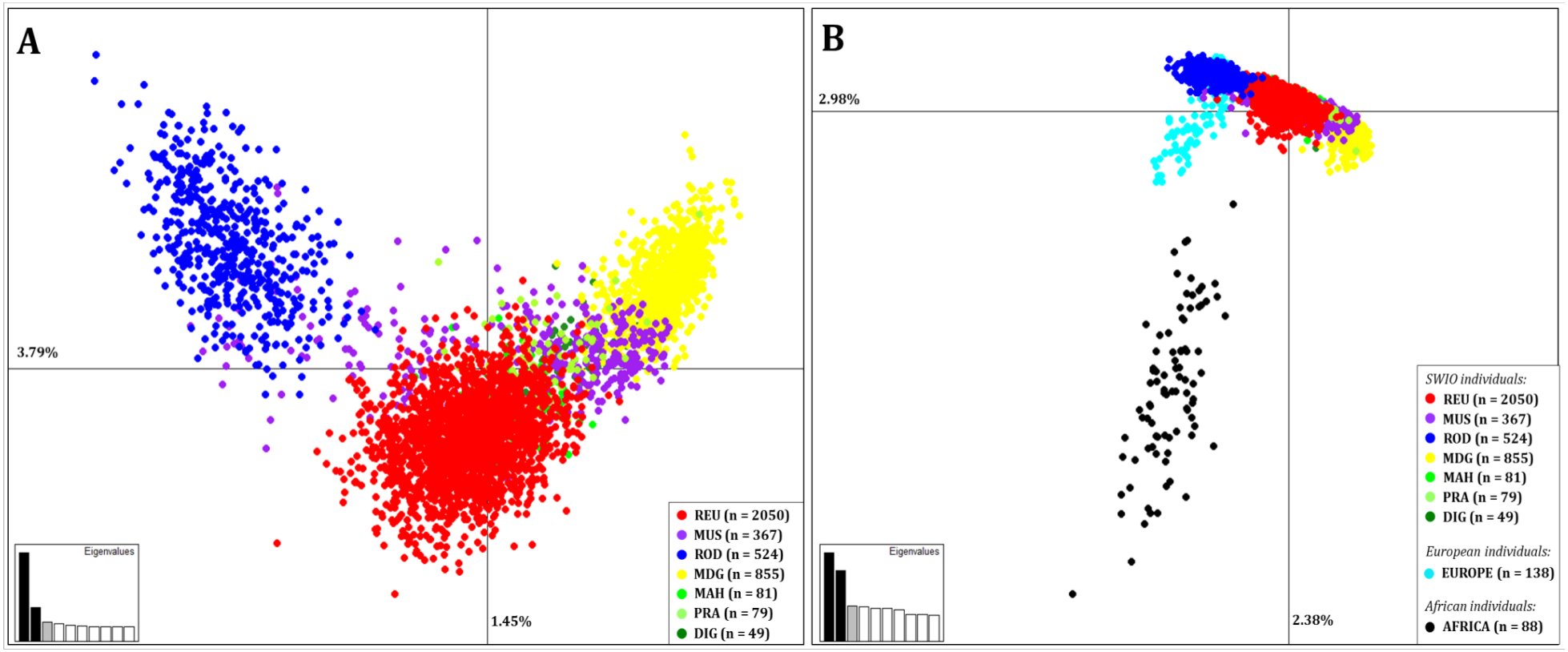


Figure V-4 : A) PCAs based on 4005 individual multilocus genotypes from the seven studied South West Indian Ocean islands, using R Adegenet package (Jombart 2008) for axis 1 and 2. B) PCAs based on 4231 individual multilocus genotypes from SWIO populations, African and European groups for axis 1 and 2. Both PCAs were based on 14 microsatellites (A: 264 alleles = variables, B: 344 variables). Inertia for each axis is indicated. Each circle represents one individual and color indicates island or African/European group. REU: La Réunion, MUS: Mauritius, ROD: Rodrigues, MAH: Mahé, PRA: Praslin, DIG: La Digue, MDG: Madagascar, AFRICA gathered Egypt, Senegal, São Tomé & Principe, Chad, Central African Republic, Gabon, Uganda, Malawi, Zimbabwe and South Africa samples, and EUROPE gathered Portugal, Spain, France, Switzerland, Germany, Italy and Greece individuals.

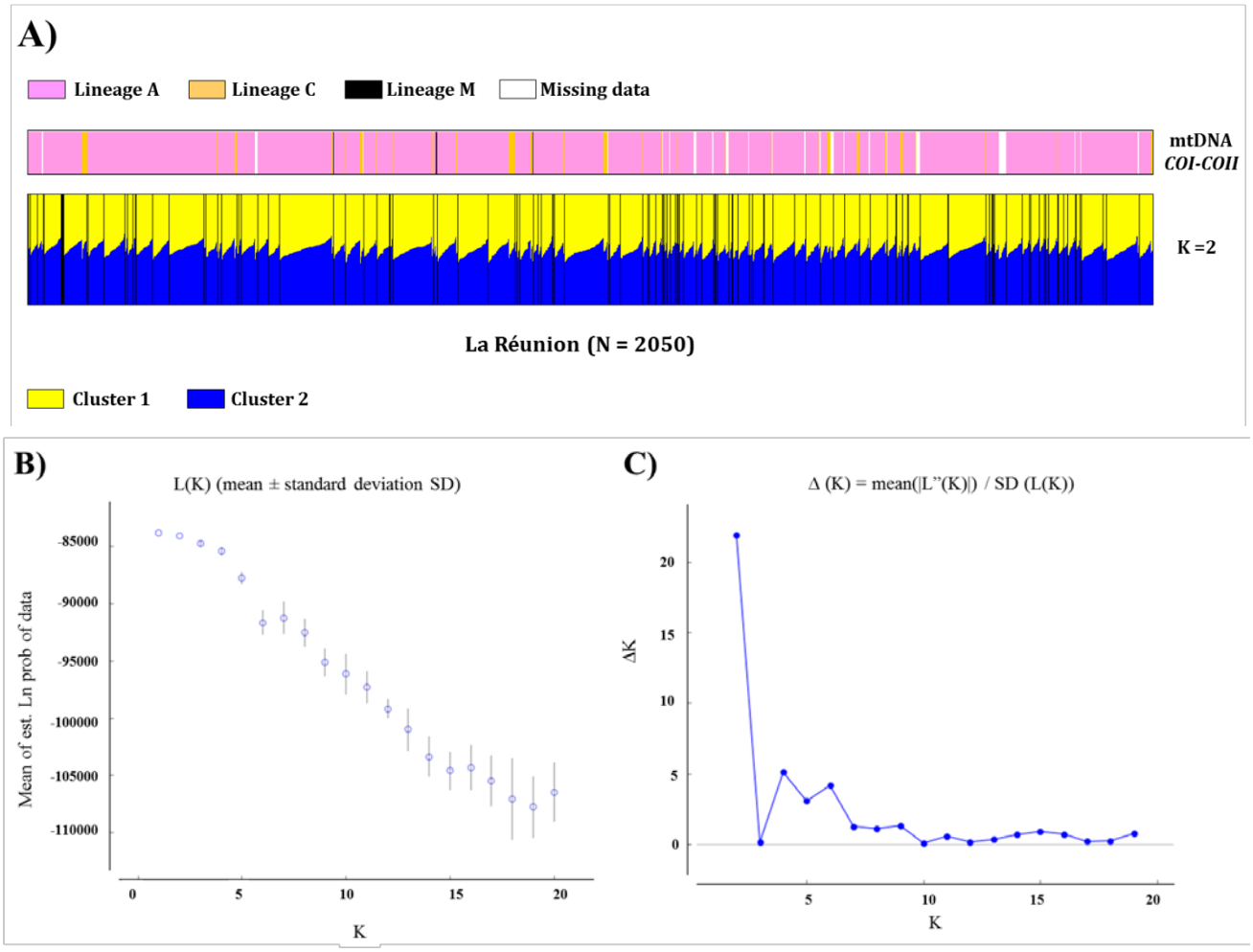


Figure V-S3 : A) Absence of population structure in the 2050 honeybee colonies sampled from 127 sites of La Réunion, inferred from 14 microsatellites loci. Each vertical bar represents one individual and the height of the bar represents the probability of assignment to a genetic cluster (one color). Sites are separated by black lines and are ordered from REU001 to 127. Maternal origin for each individual (evolutionary lineage A, C or M) defined by *DraI* test on the COI-COII intergenic region is presented on the top. B) Average likelihood of runs in STRUCTURE L(K) along with number of K clusters for La Réunion. C) ΔK, estimator of the optimal number of clusters (K) according to Evanno et al. (2005). The two graphs were done using Structure Harvester (Earl and vonHoldt, 2011).

3.4. Population structure and genetic clusters

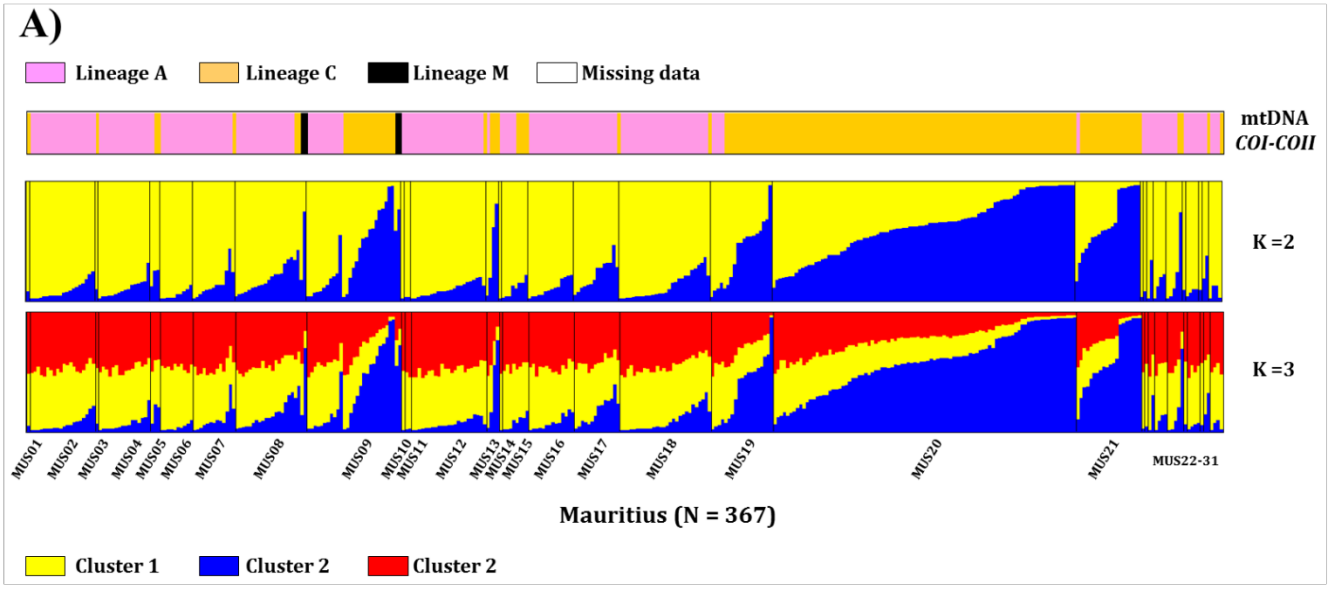
3.4.1. Population structure in the Mascarene archipelago

According to STRUCTURE and INSTRUCT analyses, no genetic structuration was found for La Réunion in which all samples colonies formed one population (*n* = 2050, Figure V-S3). When increasing K assumed genetic cluster, individual probabilities always divided equally between the assumed genetic clusters.

On the opposite, Mauritius showed a structuration and according to Evanno's method, K = 2 was the optimal number of genetic cluster (Figure V-S4). Graphical output was constructed in order to visualize if geographical site or maternal origin (represented as the mtDNA results analysis on the above bar chart of the figure S3) had an effect on the nuclear structure (Figure V-S4). Mauritius colonies were mainly assigned to cluster 1 (yellow, *n* = 258 with a threshold of 50% posterior probability PP). This cluster mostly grouped colonies with African lineage mtDNA profile (76% of the assigned individuals with more than 50%). On the other hand, 109 samples were assigned cluster 2 (blue) and only one individual had African profile (COI-COII). Among them, 83 individuals belonged to sites MUS20 and 21. So cluster 2 represented the divergent genetic diversity of European colonies from African ones. A total of 19 colonies with African mtDNA profiles showed mixed assignment between cluster 1 and 2 (maximum PP of 74.6%) and same observation was done for 97 individuals with C lineage profiles (maximum PP of 74.2%).

3.4.2. Population structure in the continental areas

Concerning continental populations, models that fitted most was K = 4 or 5 (Figure V-S5). At K = 3, African continental individuals were assigned to the pink cluster (1). By increasing the number of K, a genetic sub-structure appeared revealing the genetic divergence of São Tomé colonies from other continental African colonies. Concerning Europe, at K = 3, two genetic clusters existed in which the orange cluster (2) grouped all colonies from FRA03, Switzerland, Germany, Italy and Greece and the black cluster (3) gathered all colonies from Portugal, Spain and FRA01-02 (Figure V-S5). These two genetic clusters were linked to mtDNA lineages.



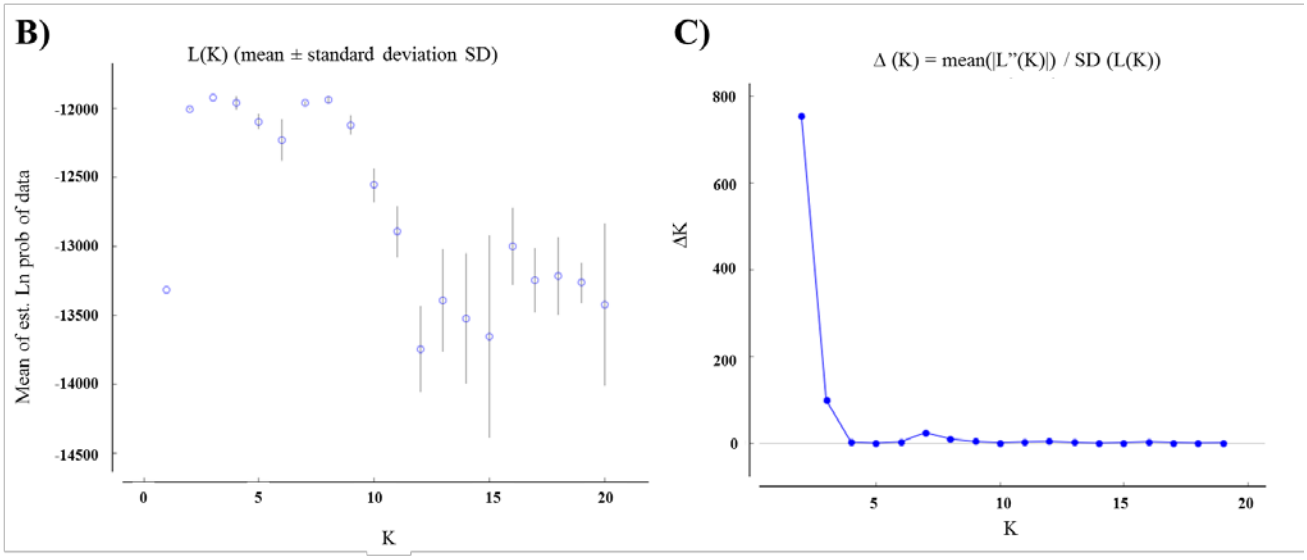


Figure V-S4 : A) STRUCTURE bar plots (K = 2 and 3) for the 367 honeybee colonies sampled from 31 sites of Mauritius, inferred from 14 microsatellites loci. Each vertical bar represents one individual and the height of the bar represents the probability of assignment to a genetic cluster (one color). Sites are separated by black lines and are ordered from MUS01 to 31. Maternal origin for each individual (evolutionary lineage A, C or M) defined by *DraI* test on the COI-COII intergenic region is presented on the top. B) Average likelihood of runs in STRUCTURE L(K) along with number of K clusters for Mauritius. C) ΔK, estimator of the optimal number of clusters (K) according to Evanno et al. (2005). The two graphs were done using Structure Harvester (Earl and vonHoldt, 2011).

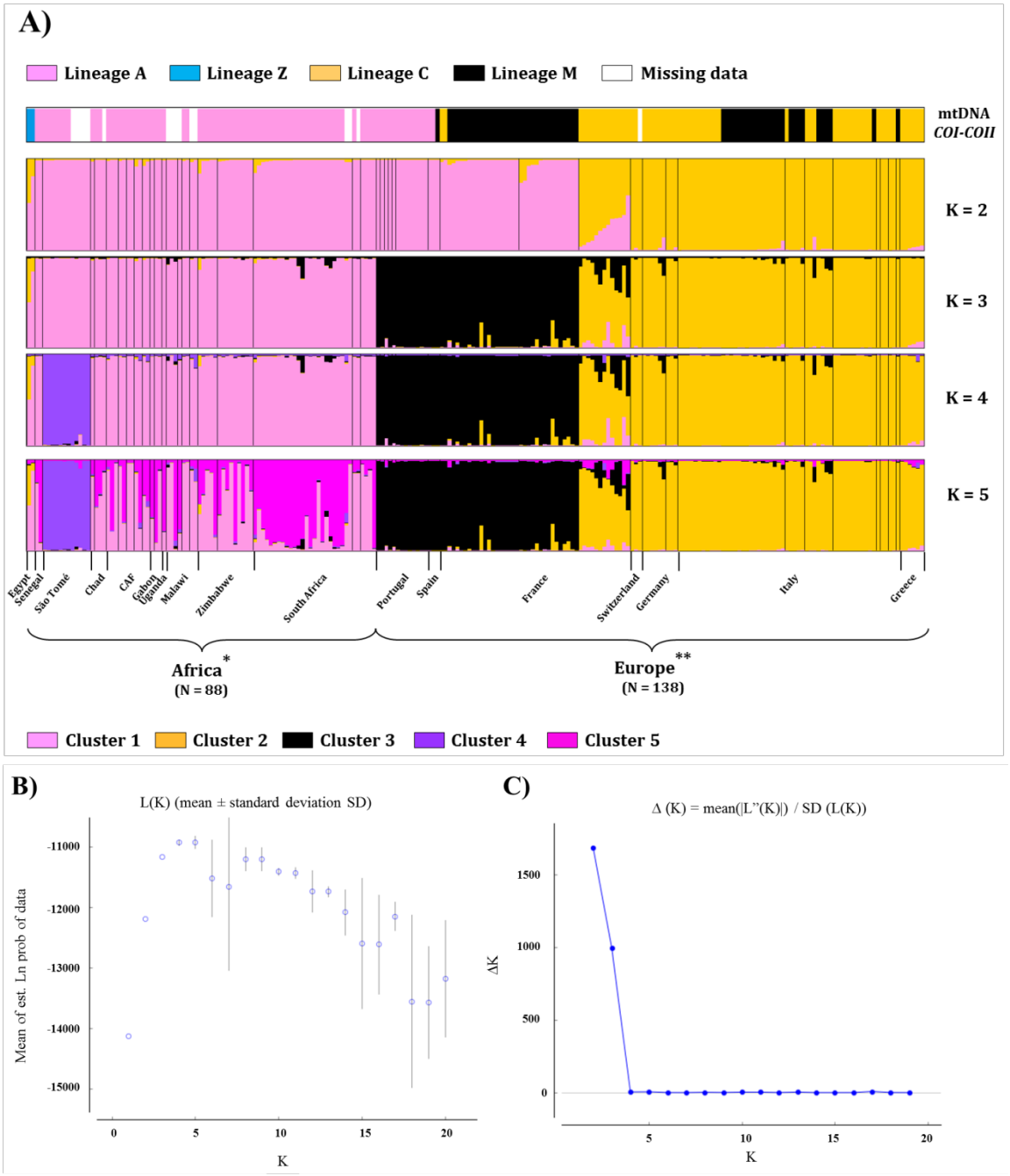


Figure V-S5 : A) STRUCTURE bar plots (K = 2 to 5) for the 226 honeybee colonies sampled in Africa and Europe, inferred from 14 microsatellites loci. Each vertical line represents the assignment posterior probability of a single individual to one or several genetic clusters (one color). Sites are separated by black lines. Maternal origin for each individual (evolutionary lineage A, C or M and Z sub-lineage) defined by PCR-RFLP *DraI* test on the COI-COII intergenic region is presented on the top. B) Average likelihood of runs in STRUCTURE L(K) along with number of K clusters for African and European sites. C) ΔK, estimator of the optimal number of clusters (K) according to Evanno et al. (2005). The two graphs were done using Structure Harvester (Earl and vonHoldt, 2011).

* African sites in the following order: EGY01, SEN01, STP01, TCHD01-02, CAF01-05, GAB01-02, UGA01, MWI01-04, ZWE01-02 and ZAF01-03.

** Europe sites in the following order: PRT01-06, ESP01, FRA01-03, CHE01, DEU01-02, ITA01-08 and GRC01.

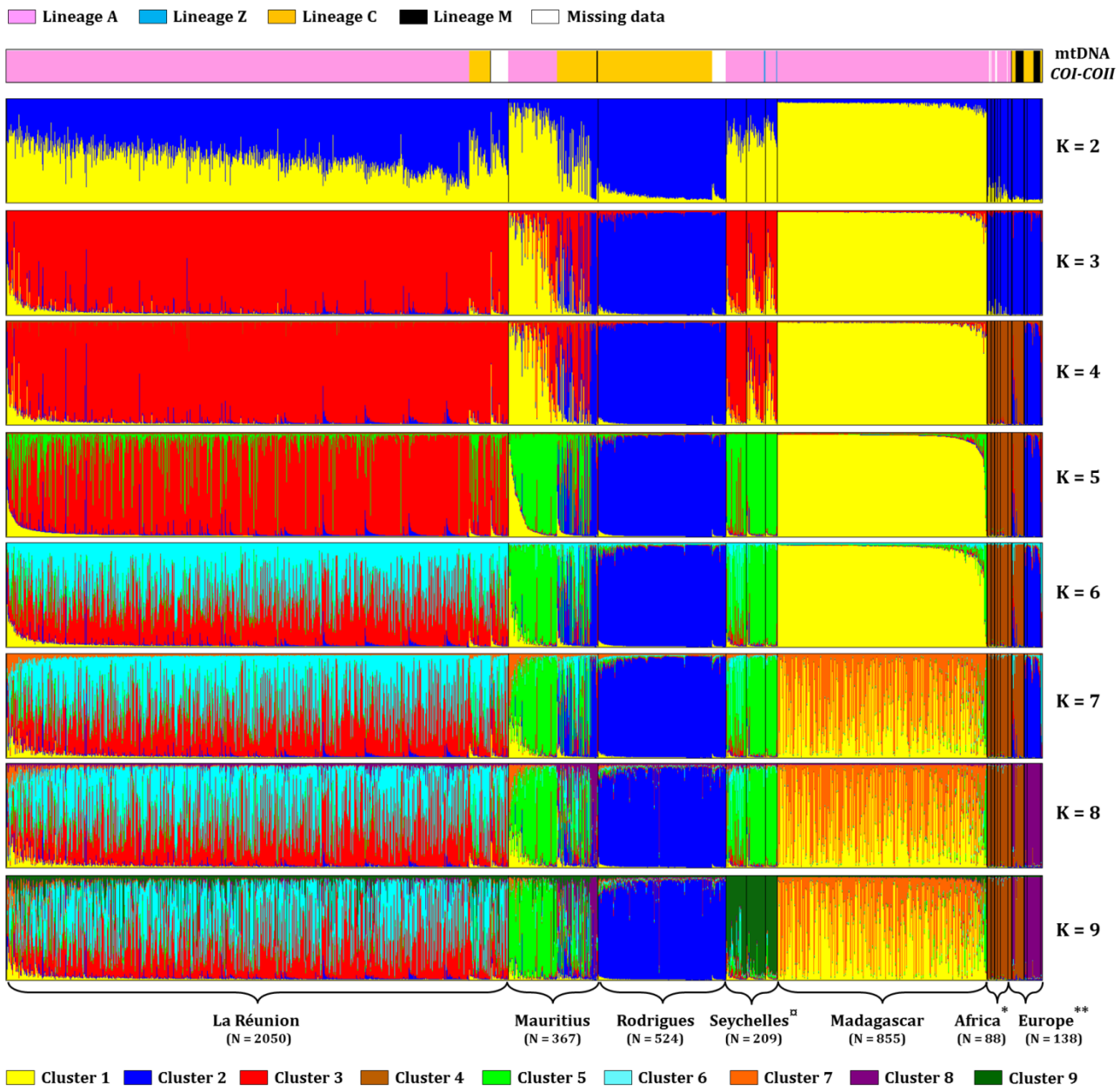


Figure V-5 : Honeybee population structure of the SWIO islands, African and European colonies, inferred from 14 microsatellites loci. STRUCTURE bar plots are presented for K = 2 to 9, based on 4231 honeybees. No prior location information was given to the Bayesian clustering analysis. Each vertical line represents the assignment posterior probability of a single individual to one or several genetic clusters (one color). SWIO islands are separated by black lines and delimitation for continental outgroups is done by country. Maternal origin of each individual (evolutionary lineage A, C or M and Z sub-lineage) defined by *DraI* test on the COI-COII intergenic region is presented on top of the STRUCTURE bar plots.

¤ Seychelles islands in the following order: Mahé, Praslin, La Digue.
* African countries in the following order: Egypt, Senegal, São Tomé & Principe, Chad, Central African Republic, Gabon, Uganda, Malawi, Zimbabwe and South Africa.
** European countries in the following order: Portugal, Spain, France, Switzerland, Germany, Italy and Greece.

The black cluster (3) corresponded to M evolutionary lineages individuals (in which previous described *A. m. iberiensis* populations already showed A or M COI-COII profiles) and orange cluster (2) corresponded to C evolutionary lineages (in which previous described *A. m. ligustica* populations showed M or C profiles) (Meixner *et al.*, 2013).

3.4.3. Global populations structure of the SWIO honeybee

According to Evanno's method (2005), the optimal K number should be two genetic clusters (Figure V-S6) but did not fit with previous observed population structure in Madagascar and Seychelles archipelago (Techer *et al.*, 2015a, Rasolofoarivao *et al.*, 2015) and neither with intra-islands and intra-continent Bayesian computations observed in this study (Figure V-5 and S7) Same difficulty was encounter with DAPC for which BIC values (Figure V-S8 and S9) did not show the expected break curve slope indicating the optimal K number. From K = 2 to K = 9, genetic clusters had a biological sense but when K incrementation exceeded 10 clusters, mis-assignment was observed by always splitting PP values of one genetic cluster into two equal parts. So here, we considered K = 9 as the optimal number of genetic clusters which also corroborates i) others population structure estimations from this study (intra-island in La Réunion and Mauritius and intra-continent) and ii) previous population structure described in others study (Rodrigues(Techer *et al.*, 2015b), Seychelles (Techer *et al.*, 2015a), Madagascar (Rasolofoarivao *et al.*, 2015) but also for Europe and Africa already demonstrated in several studies (Whitfield *et al.*, 2006, Wallberg *et al.*, 2014, Pinto *et al.*, 2014, Muñoz *et al.*, 2014b, Chapman *et al.*, 2015, Muñoz *et al.*, 2009, Alburaki *et al.*, 2013).

Considering K = 9, a population genetic structure appeared at islands and continent scales but also at intra-island scale study (Figure V-5). All African colonies together with Portugal, Spain and France colonies were grouped into one genetic brown cluster (4) with an average PP value of 94.4% (six individuals with a PP value between 63.0 and 77.5%). In parallel, all other colonies from Europe (n = 85) were assigned to the purple cluster (8) with an average PP value of 94.2% and a minimum of 73.8% for one individual of FRA03.

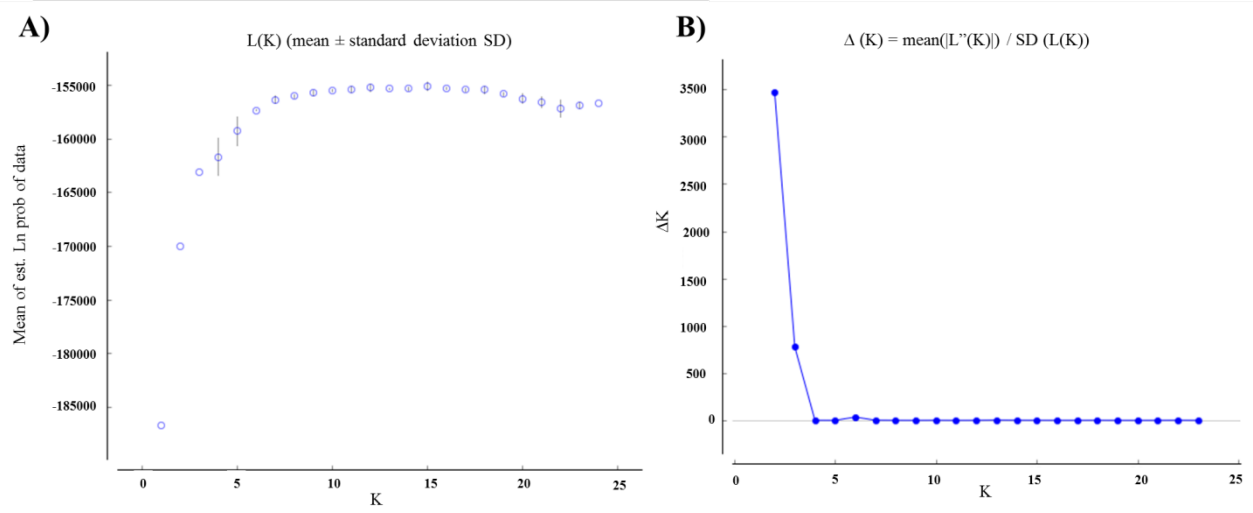


Figure V-S6 : A) Average likelihood of runs in STRUCTURE L(K) along with number of K clusters for global structure (Figure V-5). B) ΔK, estimator of the optimal number of clusters (K) according to Evanno et al. (2005). The two graphs were done using Structure Harvester (Earl and vonHoldt, 2011).

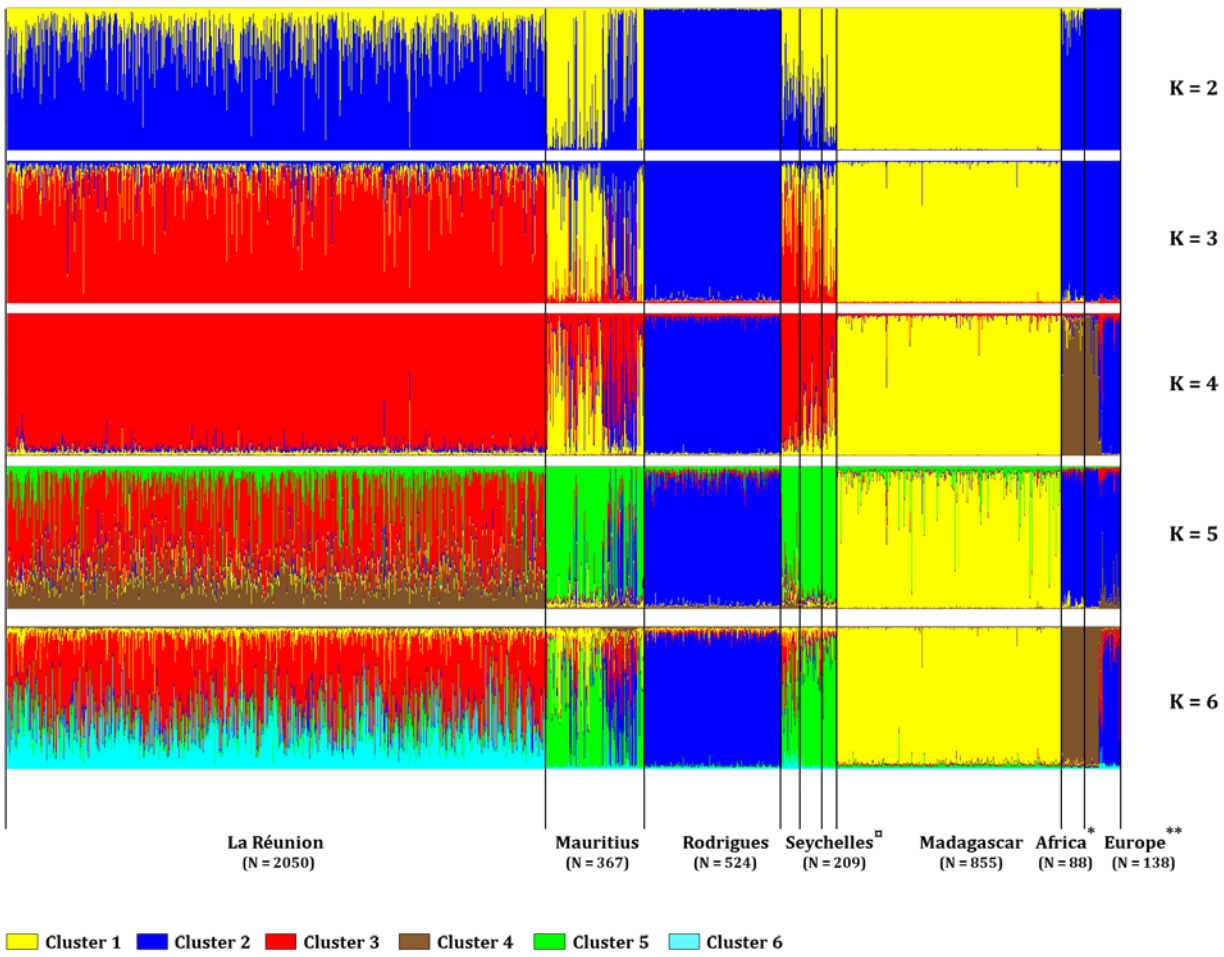


Figure V-S7 : INSTRUCT barplots of honeybee population structure of the SWIO islands, African and European colonies, inferred from 14 microsatellites loci and based on 4231 honeybees for K = 2 to 6. INSTRUCT does not require HWE conditions.

All colonies from Madagascar were assigned to different clusters to Europe and Africa either to the yellow one ((1), n = 442 with PP threshold of 50.1%), or to the orange cluster ((7), n = 350 with PP threshold of 50.0%) and to the light green cluster (5), n = 8 with a PP ≥ 51.1% and ≤ 83.0% and involving both 1990s and 2010s samples). The intra-Madagascar sub-structure was generally identical to the one described in Rasolofoarivao *et al.* (2015).

For Rodrigues samples, 522 colonies out of the 524 were assigned to the blue cluster (2) with an average PP value of 92.0% (including 16 individuals with PP ≤ 50.8% and ≥ 74.5%). One individual was assigned at 85.0% to the purple cluster (8) same as Italy. Previous K (from 2 to 7) showed that Rodrigues shared genetic diversity (similar allelic frequencies) with European colonies and started to be considered as different since K = 8 even if COI-COII profiles were identical.

For the Seychelles archipelago, K = 9 structure showed that 187 samples out of the 209 from Mahé, Praslin and La Digue were assigned to the dark green cluster (9) with an average PP of 84.9%. Two individuals from Praslin were assigned to the Malagasy clusters (one to yellow (1) with PP = 58.0% and one to orange (7) with PP = 60.8%). Finally, five individuals from Praslin and La Digue) were grouped in the light green cluster (PP ≥ 50.0% and ≤ 91.0%), one from Mahé assigned to the light blue cluster (PP = 60.1%) and all the other been mis-assigned between the two green clusters. Among the last class, most individuals were from Mahé which indicate the known sub-structuration of the archipelago with Mahé forming a genetic population different from Praslin-La Digue (Techer *et al.*, 2015a).

For La Réunion, at K = 9, all colonies were partly assigned to two genetic clusters: the red one (3) and the light blue one (6). In fact, this is not indicating a sub-structure but rather a mis-assignment confirmed by INSTRUCT outputs. From K = 3 to 4, a total of 2027 colonies out of the 2050 sampled from La Réunion were only assigned to the red cluster (3) with an average PP of 95.3% at K = 3, and 95.% at K = 4. This genetic cluster was clearly distinct from all African and Malagasy clusters.

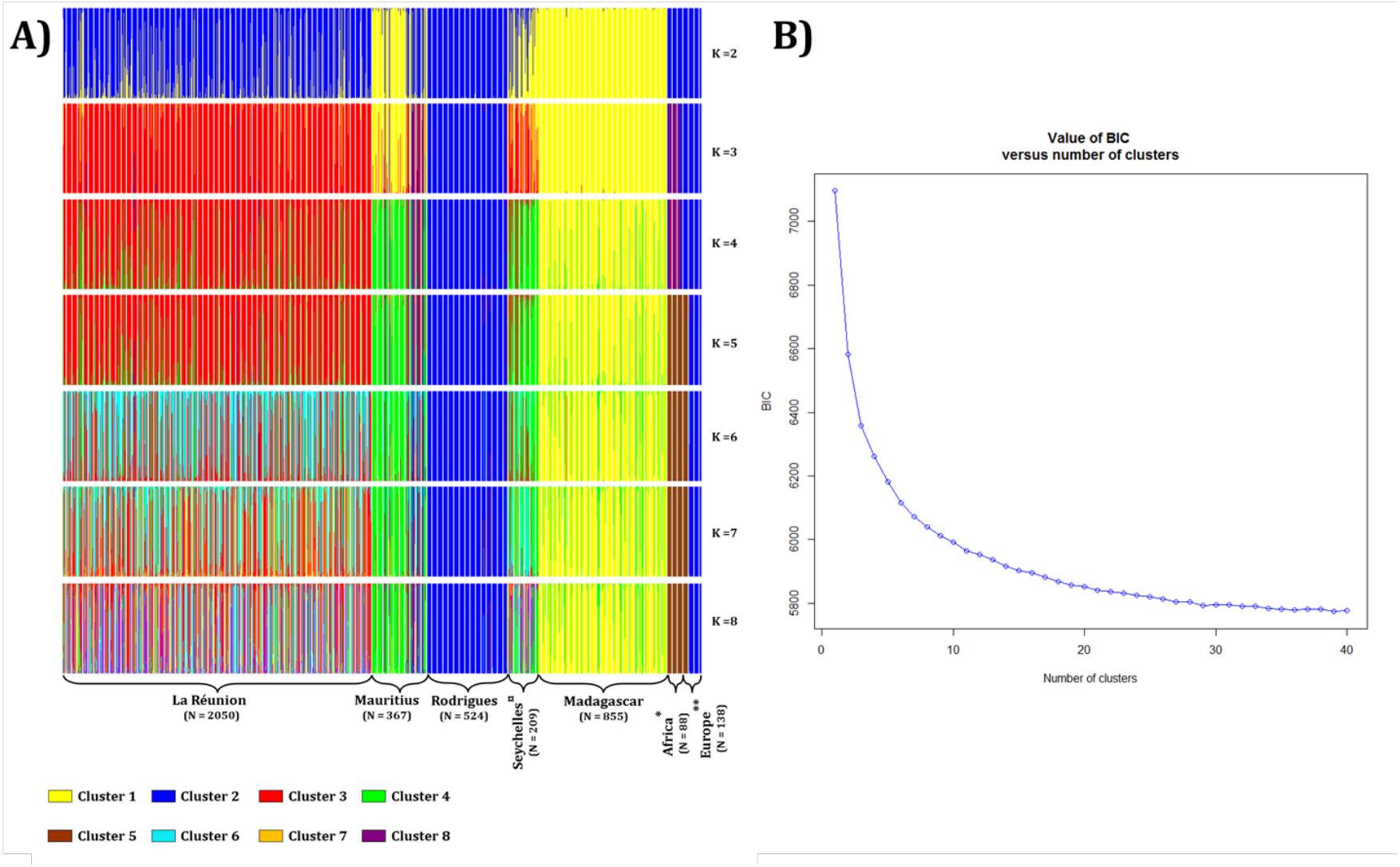


Figure V-S8 : DAPC analyses results using adegenet package with A) *compoplot* function barplots indicating assignment probabilities to a genetic cluster for each individual (one bar) from K = 2 to 8, and in B) the BIC curve values according to the number of clusters. No clear break was observed in the curve which should indicate the most probable K. Analyses were done using same dataset and populations were ordered as in STRUCTURE outputs (Figure V-5, 14 microsatellites loci, based on 4231 honeybees).

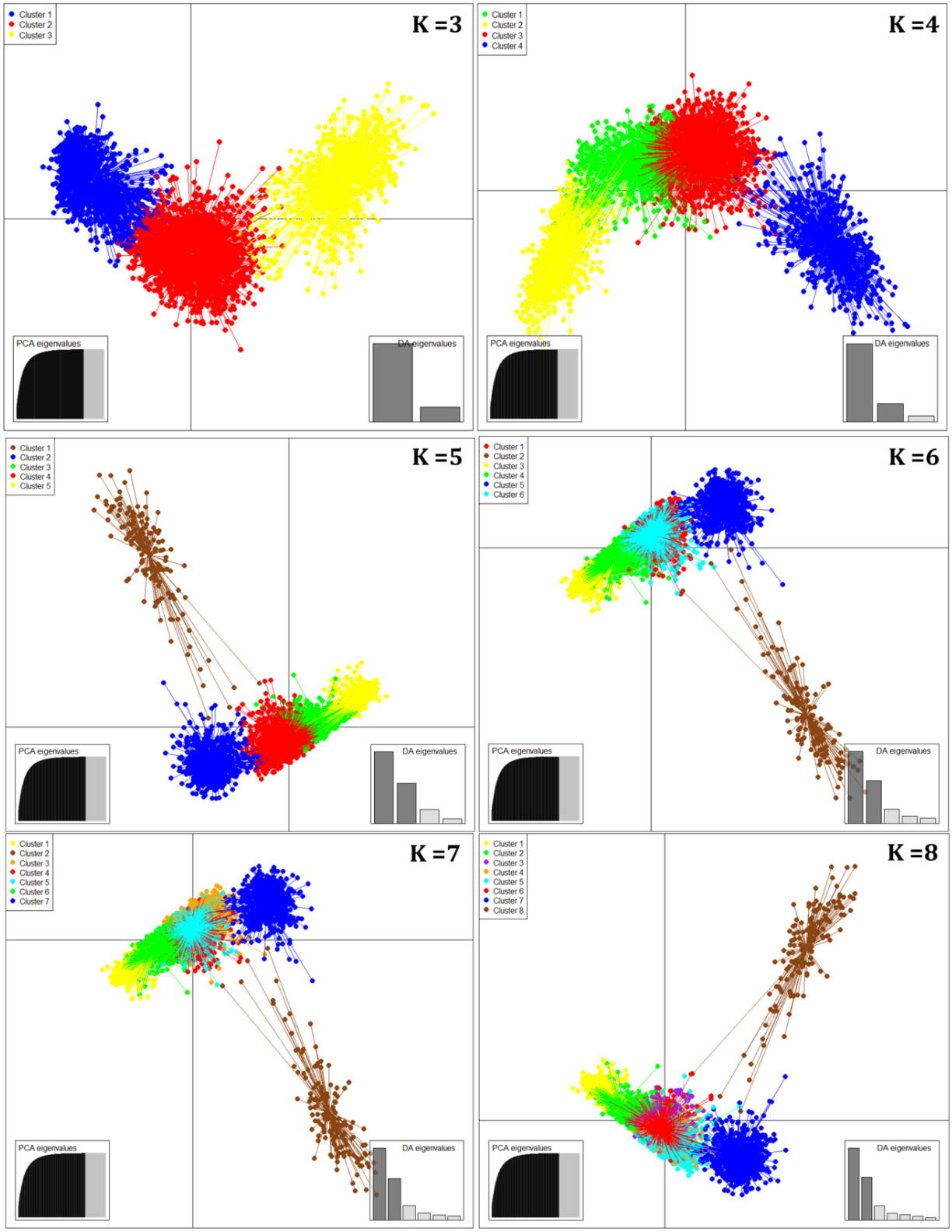


Figure V-S9 : Scatter graphical representation of the DAPC analysis on SWIO and continentals honeybee populations for K = 3 to K = 8. Each point represents one individual assigned to a genetic cluster and color indicates the genetic groups (K) same as in figure V-8. PCA eigenvalues and number of discriminant axis selected are indicated. Analyses were done using same dataset as in STRUCTURE (Figure V-5, 14 microsatellites loci, based on 4231 honeybees).

Individuals from La Réunion with C lineage showed no differences in assignment probabilities than African A lineage colonies.

Finally, Mauritius was the most complex case at K = 9 with the presence of several genetic groups in the island. The light green genetic cluster (5) was almost proper to Mauritius (at the exception of some individuals from the Seychelles, Madagascar and La Réunion) and 58.3% of the sampled individuals were assigned to this particular cluster (with an average PP of 84.1% and a minimum of 50%). A total of 37 colonies (MUS20-21) were assigned to the purple cluster (Europe C) including 20 individuals with a PP value exceeding 80%. Then, 3.3% of the colonies shared same nuclear diversity with La Réunion (red (3) and light blue clusters (6)); 2.7% with Seychelles islands (dark green cluster (9)); less than 1% with Rodrigues (dark blue cluster (2) PP ≥ 50.7%) and less than 1% with Madagascar (orange cluster (7)).

Regarding these results, the general nuclear genetic pattern followed an insular populations differentiation among i) SWIO island, ii) among islands from the same archipelago and iii) among islands and continentals populations. These populations structure was corroborated by DAPC (scatter and compoplot functions) and INSTRUCT results (Figure S7 to S9).

4. Discussion

Population genetic differentiation among islands is well documented and was even demonstrated in indigenous and endemic species with aerial dispersal capacities in the SWIO such as spiders *Nephila* (Kuntner and Agnarsson, 2011), *Miniopterus* bats (Weyeneth *et al.*, 2008), *Zosterops* birds (Milá *et al.*, 2010) and *Bemisia* insects (Delatte *et al.*, 2011). The genetic structure in oceanic islands generally reflects the effect of isolation by reducing migration between populations. On the contrary, when gene flow is regular and strong between populations, the exchange of alleles tends to homogenize their genetic composition. In addition, the differentiation is emphasized when different sources populations colonized naturally or not the islands. Populations genetics and microsatellites markers are often used to detect the evolutionary processes and understand the colonization history of insular species (Balloux and Lugon-Moulin, 2002). Here, we were able to detect the genetic differentiation in insular pattern for the honeybee *A. mellifera* from the SWIO area.

Using COI-COII intergenic region, up to three evolutionary lineages were detected but in different proportions for each island, comprising the African A lineage and both European C and M lineages. Population structure revealed contrasting pattern in evolutionary lineages composition and most probably relatively old colonization events (before human colonization?).

Contrary to what has been reported in Madagascar and in the Seychelles archipelago, honeybees from the Mascarenes are not only from the African lineage (Rasolofoarivao *et al.*, 2015, Techer *et al.*, 2015a, Techer *et al.*, 2015b). Striking differences in evolutionary lineages composition were observed among the three islands of the Mascarene archipelago.

In La Réunion, A_I sub-lineage was present in 95.2% of the sampled colonies whereas exotic C and M lineage were quite rare and only detected in 4.3 and 0.3% of the colonies, respectively. The detected African COI-COII profiles (A1 and A4) were identical to those found in *A. m. unicolor* from Madagascar, Seychelles but were also common in the African continent sampling. This finding corroborated the previous detection of A1 profile by PCR-RFLP analyses performed in 20 individuals from La Réunion and 10 from Mauritius by Franck and colleagues (2001). Using morphometric measurements, Schneider (1989) had identified *A. m. unicolor* in La Réunion colonies indicating possible Malagasy origins. Regarding the geographical proximity of La Réunion and Madagascar (900 km apart), it is plausible that honeybee colonies naturally colonized this island. Indeed, many examples in the fauna of the Mascarenes have radiated from Madagascar such as for reptile species (Raxworthy *et al.*, 2002, Austin and Arnold, 2006). However, the presence of European honeybee colonies confirmed the previous reports stating that introduction of exotic subspecies were done before the import prohibition in 1982 (Ayme, 2014). The presence of the M4 profile confirmed past importation of *A. m. mellifera*, the most frequent strain/sib-species in French populations of *A. mellifera* (Rortais *et al.*, 2011, Garnery *et al.*, 1998a). According to Bayesian analyses, the exotic C and M colonies were assigned to the same cluster as African colonies revealing i) hybridization events and ii) nuclear introgression in favor of A lineage. Asymmetric introgression has been demonstrated in honeybees and is known as the *Africanization* process (Clarke *et al.*, 2002). This reproductive advantage of African honeybees over

European was proposed to be explained by differences in sperm-related genes (Wallberg *et al.*, 2014). Another explanation is that population size of African lineage was largely superior to the introduced European colonies. It is also interesting to pointed out that among the Mascarene islands, La Réunion has the highest proportion of African colonies and also the highest proportion of non-degraded native forest habitats remaining, estimated at 25% of the original cover (Strasberg *et al.*, 2005). This difference in environmental conditions compared to Mauritius (2% of original forest cover) and Rodrigues (0% of original forest cover) surely have influenced the established population. The natural pressures exerted in La Réunion colonies may have advantage tropical locally adapted subspecies such as *A. m. unicolor* over temperate introduced subspecies such as *A. m. ligustica*, *A. m. carnica* and *A. m. mellifera*. Recent genomic analysis on 13 honeybee subspecies identified differences in vitellogenin genes between tropical African and temperate European individuals (Wallberg *et al.*, 2014). European subspecies were adapted to harshest climate conditions and showed higher capacity in vitellogenin storage in order to survive to overwintering (Amdam *et al.*, 2005). The differences in local adaptation may have impacted the competition between African and European colonies in tropical climate of La Réunion. Finally, microsatellites showed a surprising lack of spatial structuration, even if La Réunion is known to present a topographical complexity and a wide range of habitats (Strasberg *et al.*, 2005) favoring genetic structuring of populations of other insects. For example, a previous population genetic study on another insect *Bactrocera curcubitae* (Tephritidae) detected an East-West structuration pattern related to differences in climatic conditions (Jacquard *et al.*, 2013). The honeybee is used in beekeeping mainly for honey production and to increase productivity, beekeepers from La Réunion move their hives two or three time per year from lowlands to highlands, from the humid east cost to the drier west coast following availability of resources This practice contributes to put in contact distant colonies driving the homogenization of the genetic diversity pool and its effect was already described in continental honeybee populations (Cánovas *et al.*, 2011).

For Mauritius, the genetic composition was the more complex case of all SWIO islands, highlighting human impact *via* the importations and deforestation. In

our data set, Mauritius had similar proportions between local and exotic lineages, with 54.2% of colonies from African origin and the other sampled colonies belonging to the C (44.7%) and M lineages (1.1%). As in La Réunion, presence of European lineages in Mauritius corroborates historical records indicating that regular introductions were done and until recently (import prohibition 2012) (Jhumun, 2011, Bappoo and Ramanah, 1989). The M7 profile was found on the island and was also retrieved in *A. m. ligustica* populations (especially with a mixture of C1 haplotypes which was observed here with C1/C2 profile) (Franck *et al.*, 2000a). Historical reports and genetic composition of commercial stock in Australia suggested that *A. m. ligustica* colonies came from a bridgehead introduction in which Italian colonies were first introduced in Australia and later then to Mauritius (Chapman *et al.*, 2008, Jhumun, 2011). Nuclear analysis uncovered a current hybridization event in this island with two genetic groups: an African and a European one. Such phenomenon had already been depicted in other European islands and between the African and European C lineage in *A. m. iberiensis* (Muñoz *et al.*, 2014b) and in *A. m. siciliana* (Muñoz *et al.*, 2014a). The European genetic group was genetically similar to European C continental colonies and those from Rodrigues. The hybridization was detected with a cytoplasmic disequilibrium in which colonies having A_I profiles showed high introgression of European identity (at least 80%), C profiles colonies with high introgression of African identity and hybrids of the two clusters were observed. In Rodrigues, 524 colonies all from European origins significantly differentiated from European continental populations, suggesting a relatively old bottleneck event and reduction in gene flow (Techer *et al.*, 2015b). In Mauritus, two apiaries (MUS20 and 21) showed "pure" European colonies indicating a relatively recent introduction which was confirmed by field investigation and government reports (Jhumun, 2011). The high proportions of European colonies in Mauritius and Rodrigues could also be explained by strong deforestation with only 2% of the original native vegetation remaining in Mauritius and 0% to Rodrigues, replaced by high proportion of exotic plants (Thébaud *et al.*, 2009, Florens *et al.*, 2012). To better estimate level of genetic and detect potential local adaptation to tropical and temperate climate, a genomic approach could be useful to identify and study the variability of implicated genes (Savolainen *et al.*, 2013).

The comparison of genetic variability of SWIO islands and continentals populations has confirmed i) the genetic divergence between A, C and M evolutionary lineages in native area (Whitfield *et al.*, 2006, Han *et al.*, 2012, Garnery *et al.*, 1992), ii) the genetic divergence among *A. m. unicolor*, continental African subspecies and European subspecies (Rasolofoarivao *et al.*, 2015, Han *et al.*, 2012, Whitfield *et al.*, 2006), iii) the genetic proximity between Rodrigues and European C populations (nuclear comparison by Bayesian analysis) and the absence of *A. m. unicolor* in microsatellite and mtDNA dataset (Techer *et al.*, 2015b). By comparing islands and continent genetic diversity, we showed that i) La Réunion, Mauritius and the Seychelles populations were close related to Madagascar one - the potential source of origin, ii) a nuclear genetic differentiation pattern occurred among and within archipelagos with each island constituting a genetic population different from other nearest islands (excepted for Praslin-La Digue), and iii) that no continental African populations contribution was detected to explain this divergence from Madagascar in La Réunion and the Seychelles islands. Nonetheless, some evidence of exchange has been detected between archipelagos which could partly result from the common human colonization history (route to India).

The SWIO genetic populations divergence could be due to the association of bottleneck event during colonization, geographical isolation and restriction in gene flow for long-ocean distances, and past regular importations and hybridizations (Emerson, 2002). The Mascarene and Seychelles honeybee populations exhibited high levels of nuclear diversity compared to other studied insular populations such as in Macaronesia (Muñoz *et al.*, 2014b). La Réunion, Mauritius, Rodrigues and Seychelles islands (Mahé, Praslin and La Digue) presented higher genetic variability (allelic richness between 3.22 to 4.34) than Madagascar (allelic richness = 2.82) which is considered as the population of origin. Hybridization between evolutionary lineages is known as one factor of genetic enrichment in honeybee populations (Harpur *et al.*, 2012). Molecular analyses have shown that hybridizations have occurred in all islands, and honeybee introductions may have brought new alleles compared to the original pool inherited from *A. m. unicolor*. On the contrary, Madagascar population did not experienced importations from European lineages by relying on present study and on Rasolofoarivao *et al.* (2015) results. The observed diversity is

subsequently only the product of bottleneck effect during colonization and possibly to a second reduction of genetic diversity with human arrival and natural habitat destruction. Interestingly, levels of polymorphism using the 14 selected microsatellites in the Mascarene and Seychelles archipelagos were comparable to São Tomé Island (allelic richness = 3.95) but much lower than other continental African populations (allelic richness ranging from 6.76 to 7.10). This high variability is commonly observed in African populations, using mtDNA tools (Franck *et al.*, 2001, Shaibi *et al.*, 2009) or nuclear markers (El-Niweiri and Moritz, 2010, Wallberg *et al.*, 2014, Gruber *et al.*, 2013, Chahbar *et al.*, 2013, Shaibi and Moritz, 2010). Our analyses uncovered new RFLP restriction profiles in Africa (A50 and A51), in Europe in *A. m. mellifera* populations (M65) and in SWIO islands (A48 and A49). This discovers emphasized the need to better assess the African diversity which remain less studied than in Europe following beekeeping needs.

5. Conclusion

Genetic diversity and structure of the honeybee populations of the SWIO islands suggested ancient colonization events of *A. m. unicolor* from Madagascar to the Mascarene and Seychelles archipelagos, old enough to detect, within the same sub-lineage, such a pattern of population differentiation. Indeed the comparison between allelic frequencies of honeybees from Madagascar with a time step of at least 10 years showed no significant differences (same observations were made for Zimbabwe populations). Similar phenomenon was detected with also a temporal sampling (with a time gap of 10 years) in endemic honeybee populations from the Canary, Madeira and Azores archipelagos even if maternal lineages compositions differed over time (Muñoz and De la Rúa, 2012, Muñoz *et al.*, 2012a). The use of microsatellites and mtDNA COI-COII region underline the impact of exotic subspecies introduction on the genetic composition and genetic diversity of these potential indigenous species. Our results, favoring the hypothesis of a native honeybee turns out to be crucial in this hotspot of biodiversity especially as until now *A. mellifera* was mainly considered as an exotic species (Cheke, 2010). Local institutions and authors were worried about the pertinence of preserving this

species, as it interacts with several endemic plants (Kaiser-Bunbury *et al.*, 2011, Finger *et al.*, 2011, Pailler and Thompson, 1997, Pailler *et al.*, 2002, Meeus *et al.*, 2011, Hansen *et al.*, 2002, Le Péchon *et al.*, 2013, Kaiser, 2006).

The results of this study also raised some concern about Rodrigues honeybees which were exclusively from European mtDNA lineage while all others islands mainly exhibited local African mtDNA lineage. In order to state about the absence of African A. *m. unicolor* subspecies in this island it will be interesting to use a genomic approach to detect the relative contribution of European/African nuclear patrimony in this insular population. Moreover, each island of the SWIO offers a unique study system to better understand the impact of hybridization between evolutionary lineages in the genome, with different maternal composition and differentiated populations.

5. Acknowledgements

We would like to thank Patrick Turpin and Thomas François for helping in the sampling in La Réunion. We also greatly thank Rémy Baudin of the ADARA, Pascal Rousse, Brice Tocko, Yves Leconte, Pierre Franck, Jérémy Bouyer and Fani Hatjina and beekeepers of Bemlhevai for providing African and European samples. A great thank to Olivier Esnault for new samples from Mauritius and the Seychelles. We are also grateful to all beekeepers from La Réunion, Mauritius, Rodrigues and the Seychelles for their participation in this study. Finally we warmly thank both entomological teams of Mauritius (Krish Permalloo, Sookar Preeaduth, G. Jhumun and M Jamalkhan) and Rodrigues (Jerome Félicité and Nicolas Volbert) and the Seychelles Agricultural Agency (Gilbert Portlouis and Margareta) for helping in sampling in the SOOI. M. Maéva A. Techer is recipient of a Ph.D fellowship of the Sciences and Technology Doctoral School of the University of La Réunion. This study was partially funded by CIRAD and the Enlargement and sustainability of the Plant Protection Network (e-PRPV) supported by the European Union, the French government, the Région Réunion and the Département of la Réunion.

Table V-S1 : F_{ST} pair values among sites in Mauritius Island with N ≥ 5 based on 14 microsatellites. Statistical significance for the permutation tests after Bonferroni corrections is indicated by * (P < 0.000476).

	MUS04	MUS06	MUS07	MUS08	MUS09	MUS12	MUS15	MUS16	MUS17	MUS18	MUS19	MUS20	MUS21	MUS26
MUS02	0.015	0.032	0.008	0.029	**0.065***	0.012	0.056	0.009	0.039	0.004	**0.088***	**0.144***	**0.200***	0.049
MUS04		0.035	0.016	0.019	**0.062***	0.037	0.053	0.030	0.045	0.020	**0.083***	**0.138***	**0.180***	0.022
MUS06			0.046	0.042	0.075	0.054	**0.051***	0.022	0.036	0.014	0.089	**0.156***	**0.194***	0.036
MUS07				0.003	0.045	0.006	0.023	0.008	0.040	0.012	**0.069***	**0.118***	**0.154***	0.002
MUS08					0.019	0.027	0.025	0.014	0.017	0.025	0.031	**0.082***	**0.106***	-0.022
MUS09						**0.070***	0.057	0.049	0.025	0.047	0.003	**0.024***	0.039	0.007
MUS12							0.027	0.002	**0.046***	0.020	**0.088***	**0.149***	**0.201***	0.046
MUS15								0.022	0.046	0.033	0.062	**0.130***	**0.166***	0.028
MUS16									0.021	0.006	**0.065***	**0.129***	**0.173***	0.027
MUS17										0.019	0.037	**0.090***	**0.117***	0.028
MUS18											**0.062***	**0.126***	**0.169***	0.014
MUS19												0.022	0.030	0.015
MUS20													0.001	0.078
MUS21														0.088

Table V-S2 : F_{ST} pair values among sites in Africa and Europe with N ≥ 5 based on 14 microsatellites. Statistical significance for the permutation tests after Bonferroni corrections is indicated by * (P < 0.000549). STP: São Tomé, ZWE: Zimbabwe, ZAF: South Africa, PRT: Portugal, FRA: France, DEU: Germany, ITA: Italy and GRC: Greece.

	ZWE01	ZWE02	ZAF01	PRT06	FRA01	FRA02	FRA03	DEU01	ITA01	ITA02	ITA03	ITA04	GRC01
STP01	0.157	**0.136***	**0.127***	**0.356***	**0.327***	**0.276***	**0.255***	**0.327***	**0.403***	**0.372***	**0.367***	**0.412***	**0.366***
ZWE01		0.001	0.011	**0.290***	0.274	**0.219***	0.147	0.192	**0.325***	0.260	0.265	**0.318***	0.271
ZWE02			**0.011***	**0.247***	**0.228***	**0.184***	**0.144***	**0.195***	**0.324***	0.264	**0.257***	**0.313***	0.261
ZAF01				**0.212***	**0.195***	**0.154***	**0.116***	**0.174***	**0.270***	**0.222***	**0.211***	**0.261***	**0.222***
PRT06					**0.113***	**0.088***	**0.313***	**0.416***	**0.485***	0.490	**0.475***	**0.508***	**0.539***
FRA01						**0.033***	**0.265***	**0.366***	**0.440***	**0.432***	**0.412***	**0.456***	**0.482***
FRA02							**0.218***	**0.300***	**0.385***	**0.357***	**0.343***	**0.387***	**0.414***
FRA03								**0.074**	**0.139***	**0.127***	**0.115***	**0.143***	**0.135***
DEU01									**0.088***	0.042	0.089	0.056	0.119
ITA01										0.005	0.028	0.004	**0.148***
ITA02											0.027	-0.013	0.166
ITA03												0.033	0.155
ITA04													**0.168***

VI) Discussion générale et perspectives

Ouvrières à l'entrée d'une ruche exploitée à Mahé

La synthèse des résultats de la distribution des lignées évolutives, des sous-lignées (COI-COII) est présentée en figure VI-1 pour faciliter la lecture de la discussion.

1. Les origines maternelles de l'abeille du SOOI sont majoritairement de lignée évolutive africaine mais divergent de l'Afrique continentale

L'analyse de l'ADN mitochondrial de l'abeille (région intergénique COI-COII et gène ND2, **chapitre 1)** a permis de détecter trois des quatre lignées évolutives (A, C et M) dans la zone SOOI. De précédentes études avaient montré que dans certaines îles de la zone (Madagascar, Maurice et La Réunion) les colonies étudiées étaient majoritairement de lignée africaine, appartenant plus précisément à la sous-lignée tropicale A_I (Franck *et al.*, 2001, Rasolofoarivao *et al.*, 2015). En outre, notre étude révèle la présence des lignées évolutives européennes C et M seulement dans l'archipel des Mascareignes.

1.1. Une sous lignée africaine caractéristique des îles du SOOI

Dans nos analyses, nous avons mis en évidence la présence de la sous-lignée A_I dans 10 des 11 îles étudiées et ce avec l'utilisation de la méthode standardisée PCR-RFLP *DraI* (**chapitre 4**) et du séquençage de la région non-codante COI-COII (**chapitre 1**). Cette sous-lignée avait également été décrite comme commune dans toute l'Afrique, répartie dans 13 pays et trois systèmes insulaires hors du SOOI (Cap Vert, São Tomé et Principe et l'archipel des Canaries) (Franck *et al.*, 2001, Pedersen, 2001, Muñoz *et al.*, 2013). En effet, la quasi-totalité des populations d'Afrique continentale que nous avons analysées appartiennent aussi à la sous-lignée A_I confirmant les résultats d'une précédente grande étude des populations d'abeille à l'échelle de l'Afrique (Franck *et al.*, 2001). Les seules exceptions sont les deux colonies d'Egypte qui présentent des profils et séquences propres à la sous-lignée Z (anciennement nommée lignée mitochondrial O par Franck *et al.* (2001)) décrite comme un potentiel sous-groupe évolutif par Alburaki *et al.* (2013).

La sous-lignée A_I est connue pour regrouper les séquences de 14 profils de restrictions COI-COII dont A1, A4 et A6 que nous avons aussi détectés (Franck *et al.*, 2001). Toutefois, nos analyses ont révélés quatre nouvelles séquences très proches de ces groupes d'haplotypes mais présentant des profils de restriction différents. Celles-ci dérivent de séquences de type A1 (A48 et A49) et A4 (A50 et A51) suite à l'accumulation de mutations dans la région non-codante COI-COII ayant induit de nouveaux sites de restriction (5'-TTTAAA-3') de l'enzyme *DraI*.

Grâce à l'étude de la variabilité des séquences COI-COII, nous avons pu mettre en évidence une structuration interne de la sous-lignée africaine A_I. Il est apparu que toutes les séquences A_I décrites dans les îles du SOOI forment un complexe évolutif bien distinct de celles observées dans les populations d'Afrique continentale. Ce complexe A_I du SOOI présente une forte diversité, presque aussi importante que celle du complexe continental étant donné qu'il regroupe 45,9% des séquences A_I décrites (soit 28 séquences ; dans le **chapitre 1)**. En considérant les séquences ADN (P_0Q ou P_0QQ), nous avons pu observer que ces complexes sont eux même sous-structurés et scindés en deux sous-complexes. En revanche, les patrons de diversité montrent une plus forte divergence nucléotidique entre les sous-complexes P_0Q SOOI et P_0Q continental qu'au niveau intra-SOOI. Cela suggére une différenciation génétique continent – îles. L'étude de De la Rúa *et al.* (2001a) a déjà montré un exemple d'une différenciation génétique mitochondriale (région intergénique COI-COII et confirmée nucléaire) chez l'abeille *A. m. iberiensis* dans l'archipel tempéré des Canaries. Les populations établies dans ces îles possèdent des haplotypes mitochondriaux africains (sous-lignée atlantique A_{III}) qui leur sont propres et divergent par rapport à la péninsule ibérique (population d'origine).

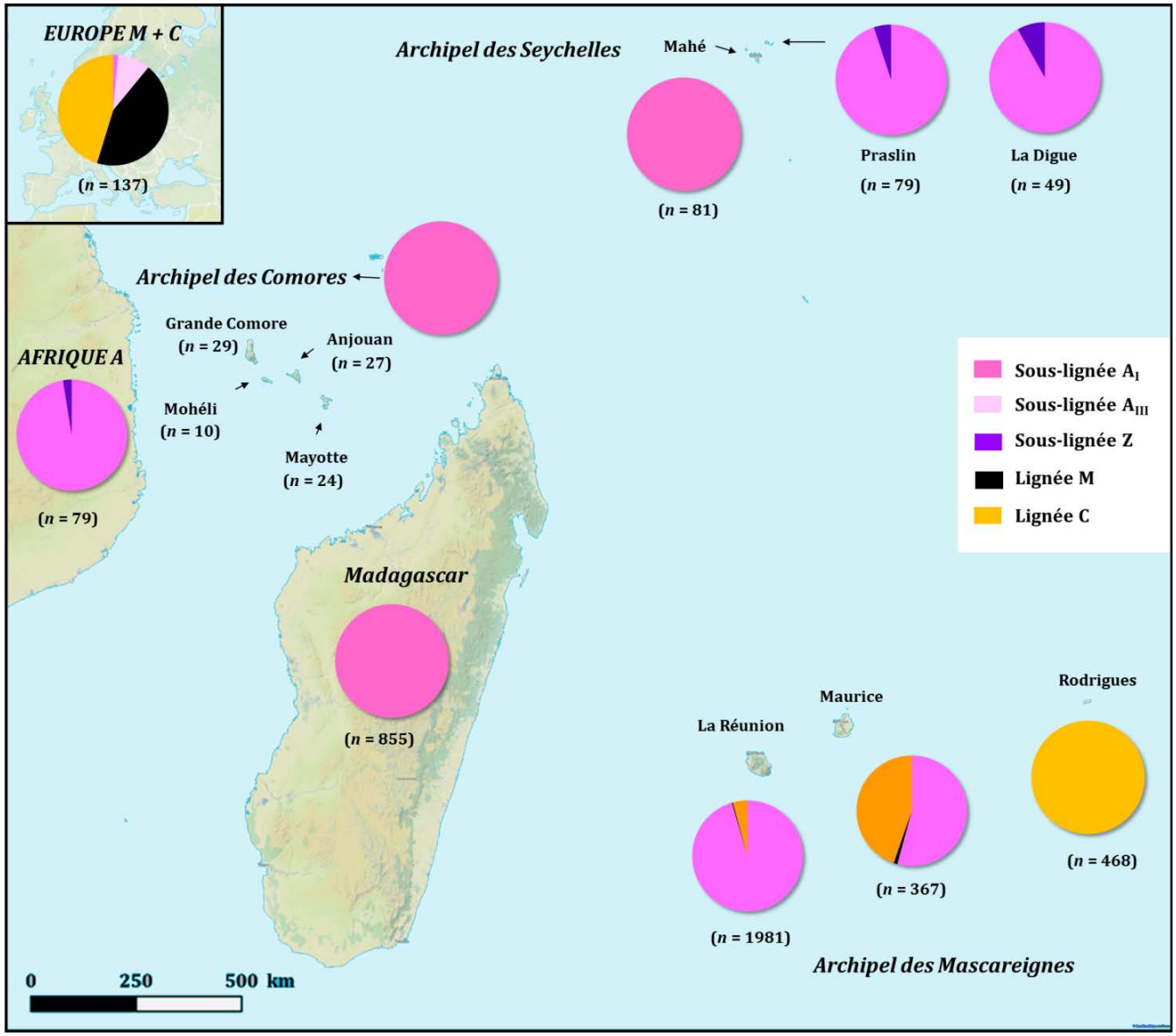


Figure VI-1 : Synthèse de la répartition des lignées évolutives A, C et M et sous-lignées (A_I, A_{III} et Z) de l'abeille dans les îles étudiées du SOOI et populations continentales d'Afrique et d'Europe analysées avec le marqueur COI-COII. ***Source du*** *fond de carte :* Open Layer Landscape.

Le patron de différenciation mitochondriale observé sur la région intergénique est soutenu par l'étude du gène codant ND2 qui a également permis de déceler une divergence entre la sous-lignée A_I du SOOI et celle du continent africain (y compris l'île de São Tomé). Nos analyses phylogénétiques ont en effet montré que les colonies A_I des archipels des Mascareignes, Comores, Seychelles et de Madagascar forment un clade africain à part. Ce clade regroupe cinq séquences nouvellement décrites et uniquement retrouvées dans ces îles (SWIO01-05). La divergence nucléotidique entre le clade A_I SOOI et celui de l'Afrique est de l'ordre de 0,96% à 1,76%. En comparaison, Arias and Sheppard (1996) ont observées une divergence plus faible de l'ordre de 0,42% (± 0,23) au sein de séquences ND2 de sous-espèces du Sud de l'Afrique (*A.m. adansonii*, *A.m. capensis*, *A.m. monticola* et *A.m. scutellata*). Le plus haut taux de divergence qu'ils ont détecté atteignait 1,71% (± 0,19) en comparant les précédentes sous-espèces africaines listées avec les sous-espèces européennes *A.m. mellifera* et *A.m. ligustica.* Aussi la divergence intra-A_I que nous avons détectée suggère une colonisation au moins aussi ancienne qu'entre deux sous-lignées voire lignées évolutives continentales. En regardant les séquences codantes ND2, il apparait que les mutations observées (n = 6 à n = 11) entre le clade A_I du SWIO (SWIO01-05) et celui de l'Afrique (AFR01-AFR08) ne sont pas toutes silencieuses et induisent jusqu'à quatre modifications dans les séquences d'acides aminées. Cette divergence est assez importante compte tenu qu'un nombre proche de mutations non-silencieuses (n = 3) a été détecté entre la sous-lignée A_I continentale (AFR01-08) et la sous-lignée Z (AFR11-13 et SWIO06).

En se basant sur les taux calibrés du genre *Drosophila* calculés à partir des gènes ND1, ND2 et ND5 (2% de divergence tous les 1 million d'années (DeSalle *et al.*, 1987)), la divergence (ND2) entre la sous-lignées A_I du SOOI et du continent africain serait estimée entre 480 000 à 880 000 ans. Ces résultats sont cohérents avec la datation de la divergence des lignées évolutives estimée en moyenne entre 1,25 MA (COI-COII) par Garnery *et al.* (1992) à 0,67 MA (ND2) par Arias and Sheppard (1996). Toutefois, l'étude génomique de Wallberg *et al.* (2014) suppose une divergence plus récente des lignées évolutives il y a 300 000 ans. En effet, l'horloge moléculaire de l'ADNmt des abeilles du genre *Apis* n'est pas connue mais des études ont montré que le taux de mutation serait plus rapide chez les Hyménoptères que chez les Diptères

(Crozier *et al.*, 1989, Castro *et al.*, 2002). Même en divisant le taux d'évolution mutationnel de moitié, il est facile de s'apercevoir que les sous-lignées africaines du SOOI ont divergé du continent bien avant l'arrivée de l'Homme dans les archipels (il y a au moins 2000 ans à Madagascar selon Burney *et al.* (2004), au VIe siècle pour les Comores et XIVe siècle pour les Mascareignes et Seychelles selon la *review* de Cheke (2010)). Le temps de divergence a été suffisamment long pour qu'une sous-spéciation ait lieu et qu'*A. m. unicolor* émerge à Madagascar se différenciant des autres sous-espèces africaines (Ruttner, 1988, Rasolofoarivao *et al.*, 2015, Han *et al.*, 2012, Whitfield *et al.*, 2006).

Cette différenciation mitochondriale ne se pose pas seulement à l'échelle des sous-lignées mais aussi au niveau des sous-espèces. En effet, les séquences A_I majoritaires ND2 (SWIO01) et COI-COII (A1_MAD3) retrouvées dans les archipels du SOOI sont également les majoritaires à Madagascar abritant la sous-espèce endémique *A. m. unicolor*. Nos résultats des marqueurs mitochondriaux et nucléaires montrent que les populations de La Réunion, Maurice, Seychelles (Mahé, Praslin et La Digue) et Comores (Grande Comore, Anjouan et Mayotte) sont très proches génétiquement de Madagascar révélant la présence d'*A. m. unicolor* en dehors de son aire endémique décrite par Ruttner (Figure VI-2). Cette sous-espèce serait potentiellement indigène de toute la zone SOOI et constitue l'un des seuls cas connu de sous-espèce d'abeille uniquement inféodée au milieu insulaire. La durée nécessaire pour la mise en place d'une différenciation dépend du taxon, de la région biogéographique mais aussi de la taille des îles (Simberloff, 1974).

1.2. Le patron de diversité des séquences COI-COII des populations d'A. m. unicolor indiquent des anciennes colonisations des archipels du SOOI

Les analyses du **chapitre 1**, nous ont permis de détecter des haplotypes ND2 de la sous-lignée A_I qui sont privés à Madagascar (SWIO 02), Grande Comore (SWIO03), Mayotte (SWIO04) et Anjouan (SWIO05). Ces données indiquent clairement une présence ancienne de la sous-espèce *A. m. unicolor* dans ces îles. En revanche, pour les Mascareignes et les Seychelles tous les individus présentant des séquences COI-COII

Figure VI-2 : Révision de la carte de distribution géographique naturelle des lignées évolutives A, C, M, O, de la sous-lignée Z et des 28 sous-espèces reconnues de l'abeille mellifère avec l'extension de l'aire de répartition naturelle d'*A. m. unicolor* incluant les archipels du SOOI. *Source du fond de carte :* Open Layer Landscape.

de type A1 (n = 24) possédaient uniquement la séquence ND2 SWIO01, majoritaire à Madagascar et aux Comores. Autrement dit, sur la seule base de cette information il n'était pas possible de statuer sur l'ancienneté de la colonisation d'*A. m. unicolor* dans ces îles. L'absence de polymorphisme du ND2 pourait aussi bien se traduire par i) d'anciens évènements de colonisations mais accompagnés de flux de gènes réguliers (isolement géographique non suffisant) ou par ii) une colonisation/introduction récente depuis Madagascar après l'arrivée de l'Homme comme le suppose plusieurs auteurs (Cheke, 2010, Bappoo and Ramanah, 1989). Or contrairement au gène ND2 impliqué dans le métabolisme énergétique de la cellule, la région COI-COII est moins soumise à pression de sélection et permet l'accumulation de mutations.

Le réseau d'haplotypes du complexe A1 (24 haplotypes) des îles du SOOI montre un patron de diversité dit en étoile (*star-like phylogenetic network*). Dans cette structure particulière, la séquence A1_MAD3 forme le nœud. Ce patron est caractéristique d'un ou plusieurs évènements de colonisation suivie d'une diversification avec expansion des populations. Ce patron typique des milieux insulaires a été retrouvé chez des espèces animales comme les chèvres dans les îles Canaries et Baléares avec l'utilisation de la région contrôle de l'ADNmt (Ferrando *et al.*, 2015) et ont indiqués des signatures d'effets de fondation. Au Japon sur l'île de Yakushima, la diversité mitochondriale de la région de contrôle du macaque endémique *Macaca fuscata yakui* a montré les mêmes patrons en étoile et aurait indiqué une diversification après au moins 7 300 ans d'isolation (suite à un évènement volcanique) (Hayaishi and Kawamoto, 2006). Dans les populations d'abeilles du SOOI, la séquence majoritaire A1_MAD3 (nœud du réseau) retrouvée dans toutes les îles exceptée à Rodrigues, a aussi été retrouvée pour la première fois en Afrique, plus précisément au Sénégal et au Malawi (**Chapitre 1**). Cette séquence a pu apparaitre dans des populations si éloignées géographiquement par convergence évolutive. Des exemples de ce processus d'évolution convergente lié à une adaptation, a déjà été décrit pour d'autres systèmes dans la zone SOOI par rapport au continent africain, notamment pour l'arbovirus Chikungunya (de Lamballerie *et al.*, 2008). Néanmoins, l'hypothèse privilégiée ici est que les individus ayant colonisés pour la première fois Madagascar possédaient cette séquence particulière. Suite à un effet fondateur ces individus se seraient adaptés localement pouvant expliquer la

divergence entre les séquences ND2 SOOI et celles du Malawi-Sénégal (AFR12-13). Enfin les individus survivants aux pressions environnementales, se sont multipliés et dispersés sur l'ensemble de l'île continentale. Les autres séquences observées seraient apparues suite à des *step-mutations* à partir de celle-ci donnant l'apparence d'une étoile au réseau d'haplotype.

D'autre part, nos résultats ont également montré que 6 des 10 îles étudiées des archipels du SOOI possédaient des haplotypes privés, très probablement dérivés de l'haplotype A1_MAD3 mais aussi d'A1_MAD12 (minoritaire de Madagascar) (Rasolofoarivao *et al.*, 2015). Ce dernier a également été détecté dans l'archipel des Comores. Ainsi d'ancien évènements de colonisation des îles des archipels du SOOI par la sous-lignée africaine A_I seraient responsables de la présence de 10 haplotypes privés aux archipels étudiés ; La Réunion ($N_{Hprivé}$ = 2), Maurice ($N_{Hprivé}$ = 2), Mahé ($N_{Hprivé}$ = 2), et Grande Comore (($N_{Hprivé}$ = 2), et Anjouan ($N_{Hprivé}$ = 1) et Mayotte ($N_{Hprivé}$ = 3). Ces haplotypes forment chacun une branche du réseau pouvant suggérer i) plusieurs évènements de colonisations indépendants de l'abeille dans les archipels et/ou ii) des histoires de colonisation interconnectées et associées à une diversification intra-île due en conséquence des différences de pressions environnementales.

1.3. L'archipel des Comores, un « passage » entre l'Afrique continentale et Madagascar ?

L'archipel des Comores exhibe des origines maternelles exclusivement africaines. Les seuls autres cas référencés de populations insulaires entièrement caractérisées par des haplotypes de lignée africaine tropicale sont le Cap Vert (Franck *et al.*, 2001, Pedersen, 2001), Madagascar (Rasolofoarivao *et al.*, 2015) et les Seychelles (Techer *et al.*, 2015a). Toutefois, des données plus récentes suggèrent que la lignée africaine atlantique A_{III} est aussi présente au Cap vert (De la Rúa *et al.*, 2006) contrairement aux îles du SOOI. La diversité des séquences ND2 a montré que l'abeille possède une histoire singulière sur chaque île de cet archipel avec la présence de l'haplotype commun du SOOI (SWIO01) en plus d'un haplotype privé à Grande Comore (SWIO03), Mayotte (SWIO04) et d'Anjouan (SWIO05). D'autre part,

au sein des îles du SOOI, un second clade africain a été détecté (gène ND2) à Mohéli (SWIO06 et AFR13) correspondant à la sous-lignée Z originellement décrite en Afrique (Alburaki *et al.*, 2013, Alburaki *et al.*, 2011, Alattal *et al.*, 2014, Franck *et al.*, 2001). Enfin le réseau d'haplotypes COI-COII permet de visualiser que les haplotypes privés des Comores sont très proches de Madagascar et de l'Afrique continentale.

Ces signaux phylogénétiques suggèrent deux hypothèses non exclusives. La première hypothèse serait qu'au vu de la localisation géographique de cet archipel, les quatre îles constitueraient une zone de contact entre l'Afrique et Madagascar et que les populations comoriennes ont divergé suite à des apports de ces deux régions. En effet, ces îles sont les plus proches du continent à environ 300 km de la côte Est Africaine et à une distance similaire du Nord-Ouest de Madagascar. Selon le modèle de la théorie de biogéographie insulaire (MacArthur and Wilson, 1967), le taux de colonisation/immigration sur l'archipel des Comores devrait être le plus élevé parmi ceux des archipels du SOOI étudiés. Aussi la diversité mitochondriale observée pourrait donc être issue d'apports plus réguliers de nouvelles populations (séquences non échantillonnées du continent par rapport aux autres archipels). La colonisation et la radiation d'espèces depuis Madagascar vers l'archipel des Comores a été démontré chez plusieurs groupes dont les caméléons du genre *Furcifer* pour qui les espèces sœurs les plus proches sont d'origines malgaches (Raxworthy *et al.*, 2002). La colonisation dans ce sens a également été démontrée dans des groupes d'arthropodes comme pour les araignées du genre *Nephila* (Kuntner and Agnarsson, 2011).

La seconde hypothèse est que la lignée africaine du SOOI aurait colonisé Madagascar en transitant par l'archipel des Comores, suivant le modèle de type *stepping-stone* (proche en proche). L'âge géologique des Comores a été récemment révisé et daterait d'au moins 10 à 20 MA (Michon, *in press.*,). Cette estimation est bien plus ancienne que celle de la divergence des lignées ce qui suppose que l'archipel aurait pu constituer une potentielle zone refuge d'*A. mellifera* pendant sa migration vers l'Afrique lors des glaciations du Pléistocène (Kotthoff *et al.*, 2013) (Figure V-3). Ainsi après une première étape de différenciation dans cet archipel, des individus auraient colonisé Madagascar qui à son tour serait devenu la population source de l'archipel des Mascareignes et des Seychelles.

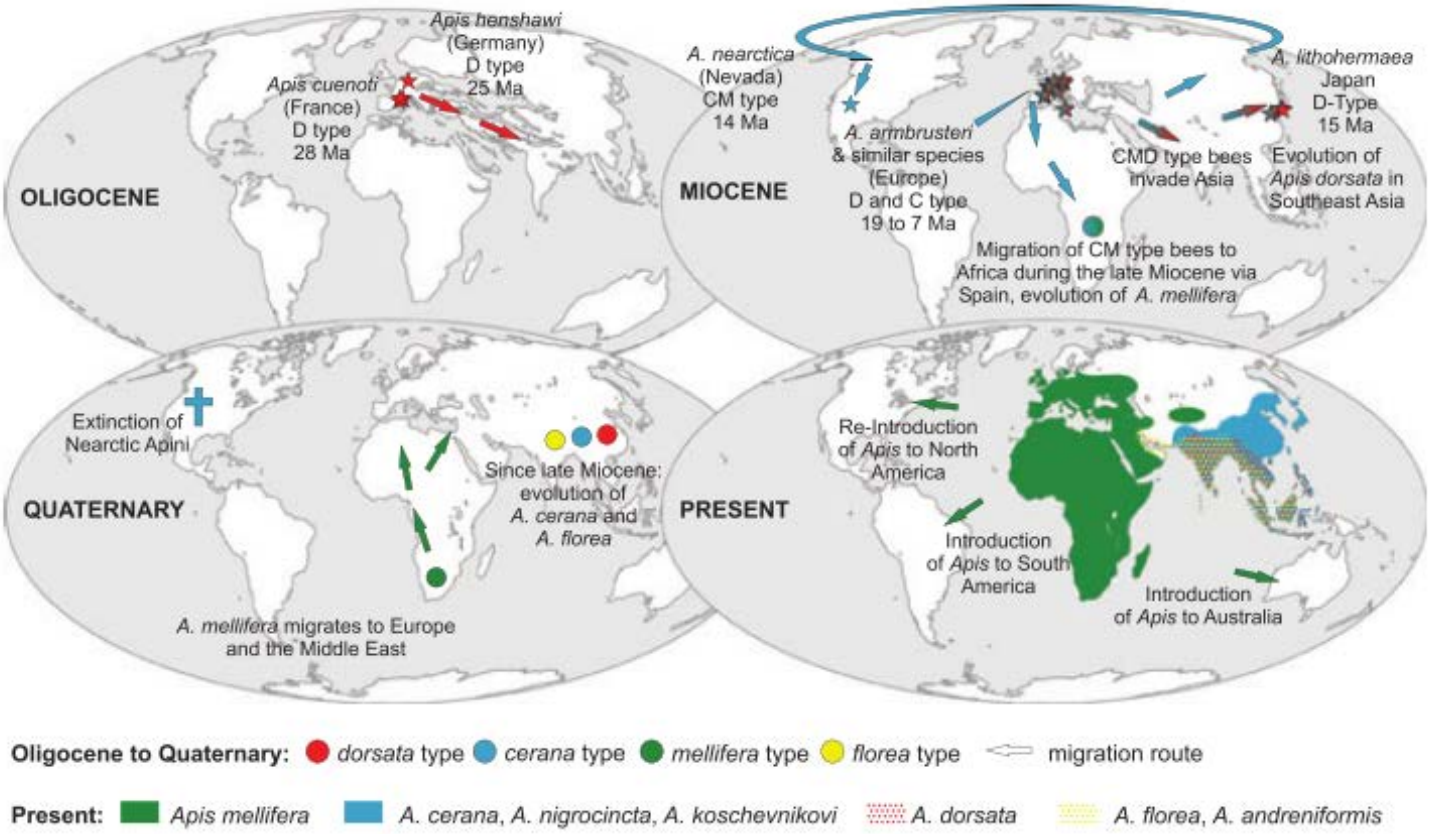


Figure VI-3 : Histoire géographique des abeilles par rapport aux découvertes de fossiles d'abeilles (étoile) et possibles routes de migration des abeilles du genre *Apis* durant l'Oligocène, Miocène, Quaternaire et distribution actuelle. La carte du quaternaire montrent que l'Afrique aurait probablement constitué une zone refuge de l'abeille *A. mellifera* qui aurait ensuite recolonisé l'Europe. *Source :* (Kotthoff *et al.*, 2013).

Le modèle *stepping-stone* incluant l'archipel des Comores comme aire d'origine a été mis en évidence chez des espèces animales comme les oiseaux du genre *Souimanga* qui auraient colonisé la zone il y a entre 1,9 à 3,9 MA (Warren *et al.*, 2003). Ce phénomène a été confirmé par l'analyse de quatre marqueurs moléculaires (*barcoding* et chloroplastiques) au sein des arbres *Psiadia*, qui suggère que l'archipel des Comores a formé un passage pour le continent africain ayant permis la dispersion du genre à Madagascar (Strijk *et al.*, 2012). La localisation géographique des Comores permet des colonisations ou échanges vers et depuis le SOOI ce qui se traduit par des histoires évolutives complexes. Hawlitschek and Glaw (2013) ont démontré cette complexité évolutive chez des geckos nocturnes du genre *Paroedura.* Selon eux, les précédentes datations géologiques de l'archipel des Comores (Hajash and Armstrong, 1972, Nougier *et al.*, 1986, Emerick and Duncan, 1982a) n'étaient pas congruentes avec les débuts de radiations de ces reptiles. Ils précisent que ce problème s'est posé à d'autres études qui retrouvaient également une divergence plus forte sur l'île de Grande Comore (plus proche du continent) par rapport aux autres îles chez des caméléons (Rocha *et al.*, 2005) et des serpents (Hawlitschek *et al.*, 2012). Or il semble improbable que ce phénomène n'ait touché que la Grande Comore au vu de sa proximité avec les autres îles de l'archipel.

1.4. Détection de la sous-lignée africaine Z dans l'archipel des Seychelles et Comores : la distance au continent joue t-elle un rôle ?

Un autre point intéressant est la présence de la sous-lignée africaine Z aux Seychelles détectée à l'aide de la région intergénique COI-COII. La caractérisation génétique des populations des Seychelles dans le **chapitre 3** avait conduit à privilégier une introduction de cette lignée, jusqu'alors uniquement reportée en Arabie Saoudite ou dans des populations du Nouveau Monde (Techer *et al.*, 2015a). L'analyse de la région ND2 a permis de confirmer la présence et la différenciation de la sous-lignée Z à Praslin et La Digue (**chapitre 1**). Les colonies de ces deux îles présentaient l'haplotype AFR12 regroupé dans un clade Z proche des sous-espèces *A. m. lamarckii* (Egypte) et *A. m. syriaca* (Jordanie et Syrie).

En dehors des colonies d'Egypte, les individus Z des Seychelles sont les seuls à présenter à la fois des haplotypes « purs » Z en ND2 et en COI-COII. En effet, l'haplotype ND2 AFR12 a aussi été retrouvé au Malawi et au Sénégal mais dont les individus appartenaient à la lignée A_I d'un point de vue de la variabilité COI-COII. Le même cas a été observé avec les colonies de Mohéli possédant l'haplotype SWIO06 privé mais l'haplotype A1_MAD3 en COI-COII. Ces résultats suggèrent que la sous-lignée Z est bien plus largement distribuée en Afrique que ce qui a été rapporté au Moyen Orient (Alburaki *et al.*, 2013, Alburaki *et al.*, 2011, Alattal *et al.*, 2014) et en Somalie (Franck *et al.*, 2001). D'autre part la découverte d'individus avec des séquences Z en ND2 et A1 en COI-COII suggère que ce sous-groupe mitochondrial A1-Z a évolué à partir de la sous-lignée A_I d'un côté et de la sous-lignée Z d'un autre. Ces résultats traduisent d'une origine continentale n'ayant pas transité par Madagascar ou non détectés dans notre échantillonnage.

Parmi les archipels étudiés, les Seychelles et les Comores sont aussi distants de Madagascar que du continent africain. La distance est plus réduite entre l'archipel des Comores et l'Afrique (environ 300 km) qu'entre les Seychelles et la côte Est africaine (plus de 1 100 km). Certains vertébrés ailés ou non ont pu coloniser Madagascar depuis l'Afrique suite à des évènements cycloniques aidant à la dispersion transocéanique (Samonds *et al.*, 2012) (Figure VI-4). Il en a pu être de même pour les abeilles aux Seychelles granitiques (séparées de l'Inde depuis 64 MA (Warren *et al.*, 2010, Torsvik *et al.*, 2013)) ou à Mohéli (au moins 10 MA (Michon, *in press.*,)) avec des apports d'individus depuis les masses continentales comme la région du Malawi. Ces tempêtes tropicales pourraient également expliquer les colonisations de la sous-lignée A_I depuis Madagascar et/ou depuis les îles des Comores vers les archipels des Seychelles et des Mascareignes. Ces données corroborent le fait que l'archipel des Comores constitue une zone de contact entre l'Afrique et Madagascar. Néanmoins, il est étonnant que les traces de la sous-lignée Z n'aient été détectées qu'à Mohéli et non sur les autres îles. En effet, Mohéli est en troisième position dans la succession des îles de l'archipel des Comores dans le sens Est vers l'Ouest. Il serait intéressant de vérifier l'absence de la sous-lignée Z par un plus large échantillonnage notamment dans les îles de Grande Comore et Anjouan.

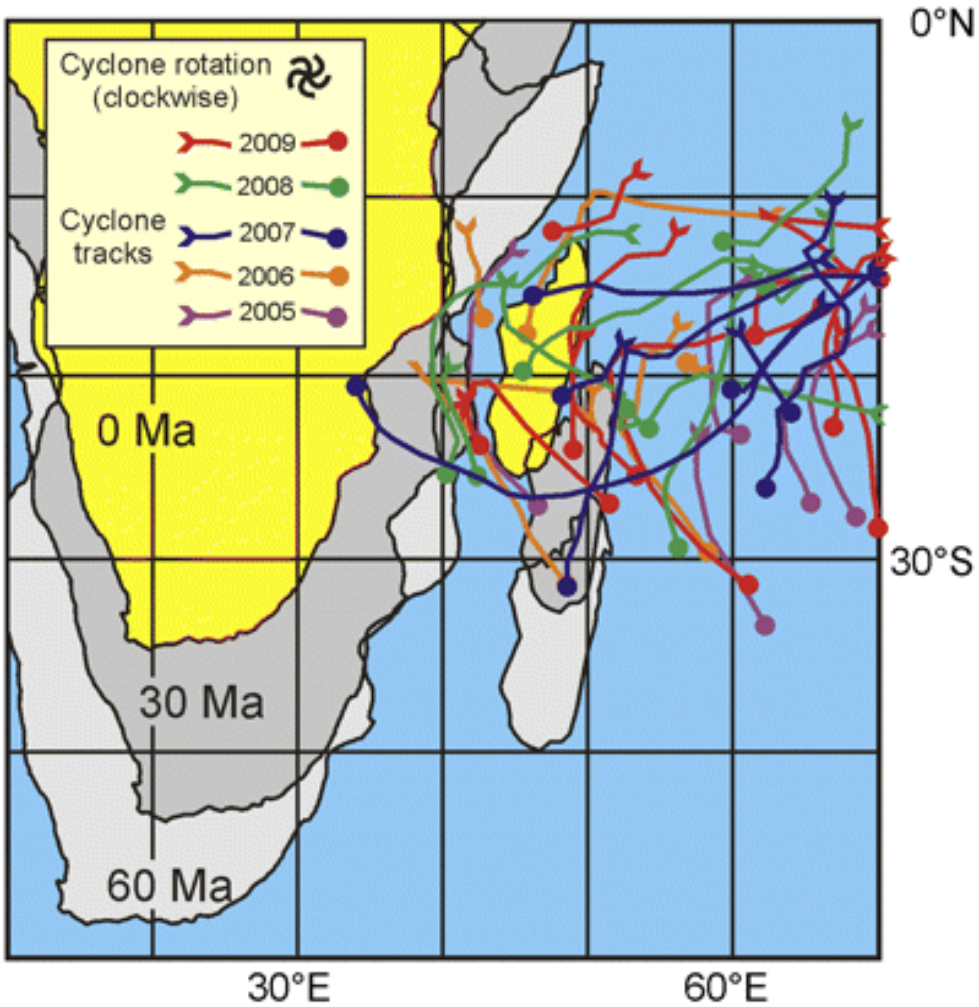


Figure VI-4 : Carte présentant i) la dérive vers le Nord de l'Afrique et de Madagascar durant le Paléocène (60 MA), Oligocène (30 MA) par rapport à leur position actuelle (0 MA) et ii) les trajectoires des cyclones pendant la période de 2005 à 2009, montrant l'influence potentielle des tempêtes tropicales aidant à la dispersion transocéanique des espèces Africaines vers le SOOI. Le symbole « > » des lignes indique le début de la perturbation climatique tandis que le point signale sa fin. *Source :* (Samonds *et al.*, 2012).

1.5. Détection d'importations dans l'archipel des Mascareignes

A La Réunion et Maurice, l'utilisation conjointe des marqueurs COI-COII et ND2 ont permis de détecter en très faible proportion des séquences de sous-lignée A_I mais uniquement retrouvées en milieu continental. Aucune autre colonie testée dans le reste du SOOI n'a montré cette situation. La présence de séquences africaines continentales des sous-espèces *A. m. scutellata* et *A. m. adansonii* plutôt distribuées dans l'Afrique de l'Ouest et centrale implique de potentielles importations passées et non référencées. La région ND2 a montré ses limites pour la détermination des sous-espèces *A. m. adansonii* et *A. m. scutellata,* pouvant échanger des flux de gènes dû à l'absence de délimitation géographique nette entre leurs vastes aires de répartition naturelle (Arias and Sheppard, 1996). Nous avons eu les mêmes difficultés à différencier ces sous-espèces mais il est certain que ces colonies sont très éloignées génétiquement de la sous-espèce *A. m. unicolor*.

L'archipel des Mascareignes est le seul de la zone SOOI pour lequel les lignées maternelles exotiques européennes ont été détectées. Chaque île présente des proportions différentes de lignées évolutives avec seulement 4,3% et 0,3% de lignée C et M à La Réunion ; près de 44,7% de lignée C et 1,1% de lignée M à Maurice et 100% de lignée C à Rodrigues. Une composition génétique similaire a été observée dans les îles de la Macaronésie montrant l'impact des importations de sous-espèces exotiques dans des milieux restreins et isolés (Muñoz *et al.*, 2013). Le séquençage de la région intergénique COI-COII a permis d'identifier la sous-espèce *A. m. carnica* (haplotype C2) dans les trois îles, *A. m. ligustica* (haplotype C1 et M7*)* à Maurice et à Rodrigues et *A. m. mellifera* (haplotype M4) à La Réunion. Selon les résultats du séquençage de la région ND2, il apparait que la sous-espèce *A. m. ligustica* ne provient pas des mêmes populations sources pour Maurice (EUR05 et EUR09) et Rodrigues (EUR07) mais sont proches des séquences observées dans l'aire de répartition naturelle de cette espèce (Italie). Ces résultats contredisent certains rapports historiques affirmant que les colonies importées à Maurice l'ont également été à Rodrigues (autonome depuis 2002) (Bappoo and Ramanah, 1989). Ainsi ces résultats confirmeraient la potentielle origine des colonies européennes du stock commercial des Etats-Unis de 1981 (moins

de 49 générations selon le **chapitre 2**) tandis que les colonies d'*A. m. ligustica* de Maurice proviendrait du stock Australien (Jhumun, 2011).

2. Structure et diversité génétique nucléaire des populations d'abeilles du SOOI

2.1. Influence de l'Homme dans les îles des Mascareignes (importations et dégradation des habitats)

Les différences de proportion de lignées européennes C et M dans l'archipel des Mascareignes seraient influencée par deux facteurs principaux liés à l'activité humaine : les importations et la déforestation. La proportion très faible de lignées européennes à La Réunion peut d'abord s'expliquer par des apports moins réguliers et plus anciens que dans les deux autres îles. Au début du XXe siècle à la suite d'importations massives reportées des sous-espèces *A. m. carnica*, *A. m. ligustica*, *A. m. mellifera* et *A. m. caucasia* à La Réunion, l'agent pathogène *Acarapis sp.* a provoqué des mortalités importantes (Ayme, 2014). Ces problèmes sanitaires ont provoqué la réaction des services vétérinaires et gouvernementaux qui ont interdit l'introduction de reines et de colonies dans l'île depuis 1982.

À Maurice et Rodrigues, les introductions d'abeilles étaient autorisés jusqu'en 2011 (Belmin, 2010, Jhumun, 2011). Pendant plus de 30 ans, des importations ont pu modifier la composition maternelle des populations de Maurice et Rodrigues au point où aucune traces ni maternelle ni nucléaire de lignée africaine n'aient été détectées dans cette dernière (Techer *et al.*, 2015b) (**chapitre 2**). L'absence de colonies d'origines africaine peut paraitre surprenante à Rodrigues. Bien que l'île soit la plus isolée géographiquement, plusieurs espèces végétales (dont le genre *Dombeya* (Le Péchon *et al.*, 2010)) et animales (geckos (Austin *et al.*, 2004), tortues géantes (Austin and Nicholas Arnold, 2001) ou encore des coléoptères (Kitson, 2012)) ont pu coloniser l'île depuis Madagascar. Les importations sont considérées comme parmi les plus

fortes menaces de la diversité des populations d'abeilles *A. mellifera* (*De la Rúa et al., 2009*, *De la Rúa et al., 2013*). L'introduction de nouvelles espèces voire sous-espèces peut induire de nouvelles pressions de sélection dans ce milieu via par exemple la compétition pour la ressource ou l'introduction de pathogènes (Suarez and Tsutsui, 2008).

Néanmoins, l'introduction n'est pas le seul facteur influençant les différents patrons de diversité observés dans l'archipel des Mascareignes. La dégradation de l'habitat a fortement affecté ces îles suite à la colonisation de l'Homme et à plus haut degré à Rodrigues (Thébaud *et al.*, 2009). Un gradient croissant d'Est en Ouest dans l'archipel a été observé quant à la proportion de lignées européennes en lien avec le taux de déforestation. Il a été estimé que 100% des habitats d'origine de Rodrigues ont été détruits et que la déforestation affectent les espèces qui y vivent dont l'oiseau endémique *Foudia flavicans* nécessitant une reforestation pour se maintenir (Impey *et al.*, 2002). L'absence de lignée africaine dans cette île suggère que si elle était auparavant présente, les colonies européennes ont été plus compétitives dans ce milieu dégradé et/ou ont été sélectionnées par l'Homme au détriment de l'abeille locale. La dégradation de l'habitat a pu aussi impacter les populations lors de perturbations climatiques importantes en réduisant la disponibilité d'abri lors des cyclones et en limitant la quantité de ressources pouvant être disponible d'autant plus restreinte lors des sécheresses (successions entre 1970 et 1980)

A Maurice, il ne reste que 2% des forêts originelles et des proportions similaires de lignée africaines et européennes sont présentes. Toutefois, en considérant le biais d'échantillonnage à Maurice - dont un tiers de la collecte concerne un apiculteur importateur - il en ressort que la lignée C serait probablement moins abondante à l'échelle de l'île. Celle-ci est en très fortes proportions chez des apiculteurs ayant introduits récemment des colonies exotiques. L'étude de Kaiser-Bunbury *et al.* (2009) a permis de voir qu'*A. mellifera* était capable d'interagir fortement avec des espèces indigènes de plantes en milieu restauré du Parc National Black River Gorges à Maurice (43 espèces dont l'espèce endémique *Psiadia terebinthina* et *Aphloia theiformis* indigène) et dans des proportions moindre dans un milieu dégradé (28 espèces dont les espèces endémiques *Sideroxylon cinereum*, *Sideroxylon puberulum* et l'espèce indigène *Antirhea borbonica*) (Figure VI-5).

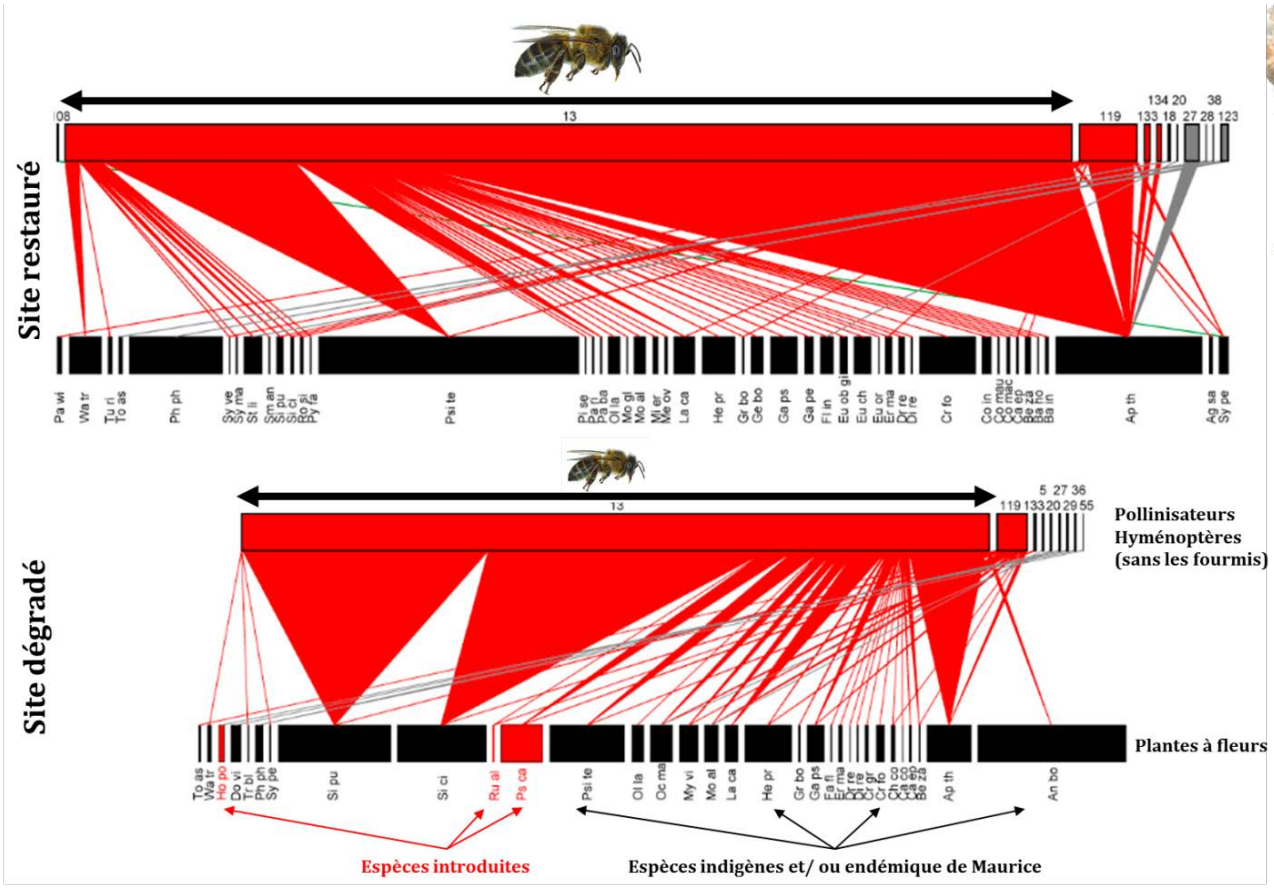


Figure VI-5 : Réseau de pollinisation entre les insectes Hyménoptères pollinisateurs et les plantes indigènes et/ou endémiques (en noir), exotiques (en rouge) en milieu restauré et dégradé de l'île Maurice. L'abondance des espèces est indiquée par la longueur des barres et l'intensité des visites est signalée par plusieurs traits. L'abeille est considérée dans cette étude comme introduite d'où sa couleur rouge. *Source :* (Kaiser-Bunbury *et al.*, 2009).

Cette capacité de super-généraliste additionnée à son capacité à parcourir de longues distances entre les patchs de ressources, a pu lui permettre de se maintenir même dans un environnement fragmenté.

Enfin les lignées européennes C et M à La Réunion étaient très faiblement représentées sur les sites échantillonnés. Ces fréquences indiquent que les colonies importées il y a plus de 30 ans ont pu se maintenir dans l'île à moins que des importations non référencées n'aient eu lieu. Contrairement aux autres îles de l'archipel, aucune trace de la sous-espèce *A. m. ligustica* que ce soit avec l'ADNmt ou les microsatellites n'a été observé. Cela renforce l'idée que la sous-espèce africaine *A. m. unicolor* ayant évolué dans des forêts tropicales à Madagascar sur une longue période, serait plus compétitive à La Réunion que les sous-espèces européennes (à en juger par sa distribution sur l'île).

2.2. Une sous-lignée caractéristique de la région SOOI mais plusieurs populations

Sans considérer les lignées évolutives européennes, les origines maternelles sont similaires voire identiques entre les îles du SOOI. En revanche, l'utilisation des marqueurs microsatellites a montré une plus forte différenciation génétique entre les différentes populations insulaires issues d'une même sous-lignée voire de colonies ayant les mêmes séquences (**chapitre 4**). Les colonies *A. m. unicolor* de La Réunion, Maurice, Mahé et Praslin-La Digue se différencient de celles de Madagascar. Cette différenciation génétique nucléaire supporte l'hypothèse (déjà suggérée par les marqueurs mitochondriaux) d'anciennes colonisations des îles du SOOI par des individus de Madagascar qui ont divergés suite à la restriction des flux de gènes. En plus de cette force évolutive, des mutations et la dérive génétique ont pu contribuer à accentuer cette différenciation avec la population d'origine.

La distance des îles entre elles et les capacités de dispersion d'une espèce sont des facteurs qui contribuent à isoler les populations insulaires. Au cours du temps, les populations qui ont colonisé les îles d'un archipel par un modèle de *stepping-stone* ou de colonisations indépendantes depuis le continent vont se différencier génétiquement. Ces phénomènes aussi appelés « effet archipel » ont structuré les populations des oiseaux du genre *Zosterops* dans l'archipel du Vanuatu (Clegg and

Phillimore, 2010) ou encore chez le primate *Tarsius syrichta* dans l'archipel des Philippines (Brown *et al.*, 2014). Ce même patron a été observé dans bien d'autres archipels comme aux Galápagos chez l'aigle *Buteo galapagoensis* constituant lui-même une « île » pour l'un de ses parasites dont la structuration de la diversité génétique suit celle de son hôte (Koop *et al.*, 2014). Selon cette étude, la capacité de dispersion de l'espèce augmente les flux migratoires entre les îles de sorte que les populations d'îles proches géographiquement sont proches génétiquement. Dans certains cas, la complexité topographique d'une île peut structurer la diversité génétique au sein même de celle-ci comme cela a été observé dans l'île du Sud-Ouest du Japon (Amami) chez la grenouille *Odorrana splendida* (Igawa *et al.*, 2013). Un tel cas de structure génétique intra-île avec présence d'échanges entre sites a aussi été mis en évidence à La Réunion chez le zoizo blanc *Zosterops borbonicus* (Milá *et al.*, 2010). Une structuration génétique a été détectée chez les orchidées *Jumellea fragans* et *J. rossi* de la Réunion, et serait liée à la diversité des habitats occupés par ces espèces (Mallet, 2014).

Les résultats de l'analyse microsatellites ont montré que les populations d'abeilles dans le SOOI se structurent par archipel et par île (**chapitre 4**). L'analyse globale de la diversité génétique nucléaire a permis de montrer que i) les populations du SOOI se différencient des populations africaines et européennes continentales, ii) que les populations insulaires du SOOI se différencient génétiquement entre elles, et iii) que les populations continentales contribuent relativement peu au patron de différenciation populationnelle entre les archipels et Madagascar (exceptée à Maurice et Rodrigues). Chacune des îles constitue une population génétique mais certains échanges ont été notés notamment entre la Réunion, Maurice et les Seychelles (**chapitre 4**). La population d'abeille à Rodrigues est autant étrangère aux autres îles de la zone SOOI que les populations continentales européennes de lignée C. La reconstruction de son histoire démographique par méthode de coalescence a montré qu'un récent évènement de goulot d'étranglement a eu lieu par lequel des colonies européennes de stocks commerciaux (*A. m. ligustica* et *A. m. carnica*) ont été importées, suivi d'une ré-augmentation de la taille efficace de la population ancestrale qui est à l'origine de la population actuelle de Rodrigues (Techer *et al.*, 2015b) (**chapitre 2**).

Contrairement aux autres études de structuration génétique, à La Réunion *A. mellifera* ne forme qu'une seule population génétique à l'échelle de l'île, et bien différenciée de Madagascar. Des hybridations passées entre lignées africaines et européennes ont probablement eu lieu mais en faveur du génome (nucléaire et mitochondrial) africain. Il a d'ailleurs été montré que les sous-espèces d'*A. mellifera* africaines possèdent un avantage reproductif favorisant les échanges asymétriques en leur faveur lors d'hybridations avec d'autres lignées évolutives (Clarke *et al.*, 2002, Wallberg *et al.*, 2014). Sans prendre en compte les facteurs anthropiques, cette absence de structuration à La Réunion peut paraitre étonnante car chez d'autres insectes volants comme *Bactrocera curcubitae,* dont la présence sur l'île est moins longue que l'abeille, une structuration Est-Ouest a pu être montrée liée aux conditions climatiques (Jacquard *et al.*, 2013). Toutefois, l'abeille est exploitée par l'Homme à La Réunion et celui-ci contribue à mettre en contact des colonies de sites éloignés (plus de 100 km, avec des variations altitudinales de moins de 10 m à plus de 1800 m par rapport au niveau de la mer) lors des transhumances bi ou trisannuelles. Ce phénomène brasse la diversité génétique et a déjà été montré comme homogénéisant des populations éloignées dans la péninsule ibérique (Cánovas *et al.*, 2011). En ce qui concerne Maurice, la structuration génétique détectée entre ruchers résulte des importations avec des groupes « purs » européens et « purs » africains ainsi que des individus hybrides. Ici, l'apport de colonies exotiques provoque une introgression du génome de la lignée européenne dans celui d'*A. m. unicolor*. Ce processus augmente la diversité génétique mais pollue également le patrimoine génétique et a déjà été renseigné à des niveaux plus faibles dans les archipels de la Macaronésie (Muñoz *et al.*, 2013). Les phénomènes d'hybridation sont à l'origine d'un accroissement de la diversité génétique dans les populations exploitées d'abeilles (Harpur *et al.*, 2013). C'est cette mise en contact entre lignées évolutives qui pourrait être en partie à l'origine de la forte diversité génétique observée dans les archipels des Mascareignes et Seychelles par rapport à celle de Madagascar (Rasolofoarivao *et al.*, 2015) en plus d'une longue période d'évolution isolée de la population d'origine.

Enfin, nous avons pu mettre en évidence l'effet île au sein d'un l'archipel sur la structuration de la diversité génétique même à une échelle très petite aux

Seychelles (**chapitre 3**). Comparée à l'archipel des Mascareignes, la distance entre les îles des Seychelles est plus de 4 fois inférieure à celle entre La Réunion et Maurice. Pourtant cette distance semble suffisante (53 km) pour que les échanges entre colonies de Mahé et celle de Praslin-La Digue (formant un groupe) soient contraints par la barrière océanique permettant une différenciation génétique. En revanche, la distance entre Praslin et La Digue montre qu'en dessous de 11km les flux de gènes sont possibles et suffisamment importants pour homogénéiser la diversité génétique nucléaire entre ces deux îles. Une abeille ouvrière est capable de parcourir en moyenne entre 2 à 3 km autour de la ruche pour butiner des ressources (Visscher and Seeley, 1982) cependant Beekman and Ratnieks (2000) ont pu observer des butineuses capables de parcourir 15 km. Les mâles *A. m. mellifera* peuvent parcourir en moyenne 7,5 km et jusqu'à 15 km pour former des congrégations (Jensen *et al.*, 2005b). Les reines vierges sont capables de parcourir une distance similaire dans le cadre de la reproduction (Jensen *et al.*, 2005b) avec un cas exceptionnel ayant parcouru une distance de 17 km depuis la colonie d'origine (Winston, 1991).

L'abeille constitue un modèle biologique présentant une forte plasticité écologique, des capacités de dispersions assez importantes et une forte variabilité intraspécifique. La région du Sud-Ouest de l'océan Indien présente une diversité d'îles et de conditions environnementales offrant ainsi un excellent système d'étude pour mieux comprendre l'écologie évolutive. La combinaison de ces deux modèles (biologique et insulaire) a permis de mieux comprendre l'influence des goulots d'étranglements, de la réduction de flux de gènes, des mutations ainsi que de l'hybridation sur la diversité et différenciation des populations.

Conclusion et perspectives

L'un des résultats majeurs de cette thèse a été de mettre en évidence la présence d'*A. m. unicolor* dans l'ensemble des îles du SOOI (excepté Rodrigues). La diversité des lignées maternelles et la différenciation nucléaire entre les îles et leur potentielle population d'origine soutiennent l'hypothèse d'une colonisation ancienne et naturelle par l'abeille de ces îles du SOOI. Les niveaux de diversité génétique (neutre) sont tels que cette colonisation serait probablement antérieure à l'arrivée de l'Homme. Cependant, la répartition de la diversité mitochondriale a également soulevé des questions :

Madagascar a-t-elle réellement été la première île à avoir été colonisée par l'abeille lors des dernières périodes glaciaires ? En effet, les populations de l'archipel des Comores mériteraient une attention particulière pour comprendre l'histoire évolutive de la sous-espèce *A. m. unicolor*. Quel est le rôle exact joué par l'archipel des Comores dans la diversification et dispersion de la lignée africaine du SOOI ? Est-ce que l'île de Grande Comore a joué un rôle de centre de dispersion de l'espèce dans les autres archipels ? Pour mieux comprendre ces processus évolutifs, il serait nécessaire i) d'intégrer des populations africaines continentales de la côte Est pouvant être des populations sources de l'archipel des Comores et ii) de poursuivre une étude plus poussée de diversité génétique à l'échelle de l'archipel.

D'autre part, la différenciation génétique des populations comme celles des Seychelles et de La Réunion dont l'origine maternelle est quasiment africaine (*A. m. unicolor*) pose la question de l'arrivée des premières colonies. Toutefois, la présence de phénomènes d'hybridation est connue pour contribuer à effacer les signaux génétiques des goulots d'étranglement indicateurs de colonisation insulaire (Emerson, 2002). Cette perte de signal est due à une restauration de la diversité génétique par la mise en contact de populations avec des fréquences alléliques différentes. De ce fait, il est plus difficile d'utiliser la méthode de coalescence basée uniquement sur les marqueurs microsatellites comme cela a été réalisé pour Rodrigues. Les modèles permettant de retracer cette histoire devront prendre en compte ces phénomènes de métissage. Une des méthodes alternatives serait également d'obtenir des échantillons plus anciens des îles du SOOI (provenant des

collections de muséum) afin de pourvoir dater et obtenir une horloge moléculaire plus adaptée au modèle.

La sous-espèce *A. m. unicolor* décrite à Madagascar par Ruttner (1988) est considérée comme moins agressive par rapport à d'autres sous-espèces comme *A. m. capensis* ou *A. m. scutellata*. Cette perte de comportement défensif est reconnu comme l'un des traits du syndrome d'insularité et a été démontrée chez des populations d'abeilles introduite à Porto Rico (Rivera-Marchand *et al.*, 2012). Ce trait d'histoire de vie ainsi que sa plus petite taille en comparaison des autres sous-espèces (Ruttner, 1988) traduisent l'évolution particulière des espèces dans les milieux insulaire. Contrairement à d'autres métissages entre lignées A et C/M, les colonies d'abeilles à La Réunion, Maurice et Seychelles (A et Z) ne sont pas reconnues comme extrêmement agressives ce qui n'est pas le cas de l'abeille africanisée dite « tueuse » du Nouveau Monde (Winston, 1994, Schumacher *et al.*, 1989). Des premières résultats d'une étude morphométrique sur la base de critère alaires chez les abeilles de l'archipel des Mascareignes et des Seychelles a montré une différenciation morphologique entre les populations insulaires qui serait aussi liée à la différenciation génétique (Galataud, 2015). Cette divergence morphologique pourrait traduire l'évolution de l'abeille sous des pressions de sélection de milieu insulaire. Ainsi il serait intéressant d'approfondir les connaissances sur la morphologie et le comportement de l'abeille du SOOI, qui pourrait être localement adaptée à la flore locale (plus petite taille ?).

L'absence de lignée africaine à Rodrigues à la fois à l'aide de marqueurs sur l'ADN mitochondrial et nucléaire pose la question de détection et de résolution de ces marqueurs. Bien que les 14 microsatellites (communs à toutes les études) utilisés se soient avérés suffisamment performants pour différencier des lignées évolutives (A, C et M), sous-lignées (A_I, A_{II}), sous-espèces (ex : *A. m. unicolor* vs *A. m. ligustica*) et populations, il est possible qu'ils ne puissent pas détecter des traces africaines localisées dans des parties précises du génome (dans le cas où elles existeraient). Aussi il s'avèrerait utile d'utiliser une approche génomique pour statuer sur les contributions relatives des lignées européennes et potentiellement africaine dans le patrimoine génétique de l'abeille de Rodrigues. D'autre part, chaque population insulaire d'abeille de la zone SOOI a montré être singulière à la fois par la

contribution relative des lignées évolutives dans la composition de la population mais aussi de la différenciation génétique nucléaire existante entre les îles. Aussi le SOOI offre un excellent cadre d'étude avec différents laboratoires naturels pour étudier les phénomènes d'hybridations entre lignées et leurs impacts sur le génome de l'abeille. Il serait d'autant plus intéressant d'étudier la variabilité au sein des gènes impliqués dans les adaptations locales et conditions climatiques comme le stockage de vitellogènine pour l'hivernage chez les sous-espèces de milieu tempéré. Des premières différences entre les sous-espèces africaines de milieu tropical et celles de milieux tempérées ont été détectées par Wallberg *et al.* (2014) avec une forte différenciation entre la lignée A, C et M dans le gène récepteur de la vitellogènine ou encore entre la lignée A et M avec un gène immunitaire (*Hml*) (Figure VI-6).

Enfin, les données du génome complet permettrait d'identifier des signatures d'expansion et de réduction de populations (Zayed and Whitfield, 2008) et de dater plus précisément les goulots d'étranglements associées à la colonisation des îles et/ou à la réduction des tailles des populations suite à la destruction des niches écologiques (déforestation).

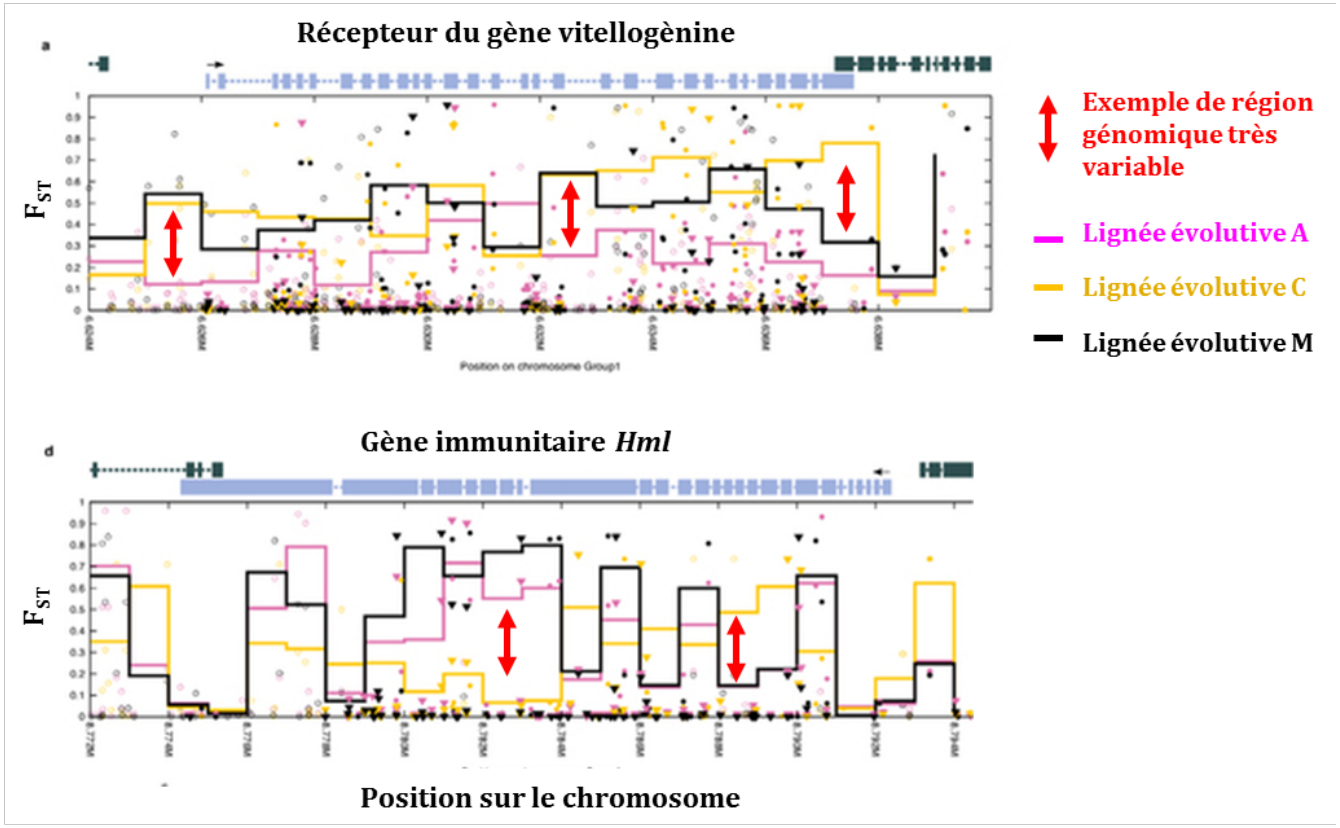


Figure VI-6 : Exemples de variabilités génomiques et sites SNPs entre les lignées évolutives A, C et M d'abeille *A. mellifera* impliquant les gènes a) du récepteur de la vitellogènine et en b) immunitaire *Hml*. *Source* : modifié de Wallberg *et al.* (2014).

Références bibliographiques

ALATTAL, Y., ALSHARHI, M., ALGHAMDI, A., ALFAIFY, S., MIGDADI, H. & ANSARI, M. 2014. Characterization of the native honey bee subspecies in Saudi Arabia using the mtDNA COI–COII intergenic region and morphometric characteristics. *Bulletin of Insectology*, 67, 31-37.

ALBURAKI, M., BERTRAND, B., LEGOUT, H., MOULIN, S., ALBURAKI, A., SHEPPARD, W. S. & GARNERY, L. 2013. A fifth major genetic group among honeybees revealed in Syria. *BMC Genetics*, 14, 10 p.

ALBURAKI, M., MOULIN, S., LEGOUT, H., ALBURAKI, A. & GARNERY, L. 2011. Mitochondrial structure of Eastern honeybee populations from Syria, Lebanon and Iraq. *Apidologie*, 42, 628-641.

AMDAM, G., NORBERG, K., OMHOLT, S., KRYGER, P., LOURENCO, A., BITONDI, M. & SIMOES, Z. 2005. Higher vitellogenin concentrations in honey bee workers may be an adaptation to life in temperate climates. *Insectes Sociaux*, 52, 316-319.

ARIAS, M. C. & SHEPPARD, W. S. 1996. Molecular phylogenetics of honey bee subspecies (*Apis mellifera L.*) inferred from mitochondrial DNA sequence. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 5, 557-66.

ARIAS, M. C. & SHEPPARD, W. S. 2005. Phylogenetic relationships of honey bees (Hymenoptera: Apinae: Apini) inferred from nuclear and mitochondrial DNA sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 37, 25-35.

ASCHER, J. & PICKERING, J. 2012. Discover Life bee species guide and world checklist (Hymenoptera: Apoidea: Anthophila). *Pickering [Электронный ресурс].–2013. Режим доступа: http://www. discoverlife. org/mp/20q.*

AUSTIN, J. J. & ARNOLD, E. N. 2006. Using ancient and recent DNA to explore relationships of extinct and endangered Leiolopisma skinks (Reptilia: Scincidae) in the Mascarene islands. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 39, 503-511.

AUSTIN, J. J., ARNOLD, E. N. & JONES, C. G. 2004. Reconstructing an island radiation using ancient and recent DNA: the extinct and living day geckos (Phelsuma) of the Mascarene islands. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 31, 109-122.

AUSTIN, J. J. & NICHOLAS ARNOLD, E. 2001. Ancient mitochondrial DNA and morphology elucidate an extinct island radiation of Indian Ocean giant tortoises (Cylindraspis). *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 268, 2515-2523.

AYME, A. 2014. *Synthèse des connaissances sur l'apiculture réunionnaise et enjeux pour la filière.* Doctorat Vétérinaire, Université Paul-Sabatier de Toulouse.

BALLOUX, F. & LUGON-MOULIN, N. 2002. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular ecology,* 11, 155-165.

BAPPOO, D. R. & RAMANAH, D. The state of beekeeping in Mauritius and other Mascarene Islands. Proceedings Fouth International Conference on Apiculture in Tropical Climates, 6-10 November 1988 1989 Cairo, Egypt. 2.

BASIST, A., BELL, G. D. & MEENTEMEYER, V. 1994. Statistical relationships between topography and precipitation patterns. *Journal of climate,* 7, 1305-1315.

BEEKMAN, M. & RATNIEKS, F. 2000. Long-range foraging by the honey-bee, Apis mellifera L. *Functional Ecology,* 14, 490-496.

BELKHIR, K., BORSA, P., CHIKHI, L., RAUFASTE, N. & BONHOMME, F. 1996. GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. *Laboratoire génome, populations, interactions, CNRS UMR,* 5000, 1996-2004.

BELMIN, R. 2010. *Intérêt et faisabilité d'une Indication Géographique pour le miel de Rodrigues.* Master FAGE, Université de Nancy.

BENDJEDID, H. & ACHOU, M. 2014. Etude de la diversité morphométrique de deux populations d'abeilles domestiques (*Apis mellifera intermissa* et *Apis mellifera sahariensis*) du sud Algérien. *Revue Scientifique et Technique (Paris),* 28, 84-95.

BERGER, S., WIKELSKI, M., ROMERO, L. M., KALKO, E. K. & RÖDL, T. 2007. Behavioral and physiological adjustments to new predators in an endemic island species, the Galapagos marine iguana. *Hormones and Behavior,* 52, 653-663.

BLACKMORE, S., CHIN, S.-C., CHONG SENG, L., CHRISTIE, F., INCHES, F., WINDA UTAMI, P., WATHERSTON, N. & WORTLEY, A. H. 2012. Observations on the Morphology, Pollination and Cultivation of Coco de Mer (*Lodoicea maldivica* (JF Gmel.) Pers., Palmae). *Journal of Botany,* 2012, 13 p.

BLANCHARD, F. 2000. Guide des milieux naturels: La Réunion, Maurice, Rodrigues. *Paris: Eugen Ulmer 384p.-illus., col. illus.. ISBN 2841380998 Fr Icones, Maps. Geog,* 5.

BLONDEL, J. 1986. *Biogéographie évolutive,* Masson Paris.

BLONDEL, J. 1995. Biologie insulaire et le syndrome d'insularité. *Les Cahiers du Conservatoire du littoral,* 84-95.

BLUMSTEIN, D. T. & DANIEL, J. C. 2005. The loss of anti-predator behaviour following isolation on islands. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences,* 272, 1663-1668.

BOCK, D. G., CASEYS, C., COUSENS, R. D., HAHN, M. A., HEREDIA, S. M., HÜBNER, S., TURNER, K. G., WHITNEY, K. D. & RIESEBERG, L. H. 2014. What we still don't know about invasion genetics. *Molecular Ecology*, n/a-n/a.

BOFF, S., SORO, A., PAXTON, R. J. & ALVES-DOS-SANTOS, I. 2014. Island isolation reduces genetic diversity and connectivity but does not significantly elevate diploid male production in a neotropical orchid bee. *Conservation Genetics*, 1-13.

BONNEVILLE, A., BARRIOT, J. P. & BAYER, R. 1988. Evidence from geoid data of a hotspot origin for the southern Mascarene Plateau and Mascarene Islands (Indian Ocean). *Journal of Geophysical Research: Solid Earth (1978–2012)*, 93, 4199-4212.

BOURSOT, P. & BONHOMME, F. 1986. Génétique et évolution du génome mitochondrial des Métazoaires. 18, 73.

BRADLER, S., CLIQUENNOIS, N. & BUCKLEY, T. R. 2015. Single origin of the Mascarene stick insects: ancient radiation on sunken islands? *BMC Evolutionary Biology*, 15, 196.

BREEZE, T. D., BAILEY, A. P., BALCOMBE, K. G. & POTTS, S. G. 2011. Pollination services in the UK: How important are honeybees? *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 142, 137-143.

BREEZE, T. D., VAISSIÈRE, B. E., BOMMARCO, R., PETANIDOU, T., SERAPHIDES, N., KOZÁK, L., SCHEPER, J., BIESMEIJER, J. C., KLEIJN, D. & GYLDENKÆRNE, S. 2014. Agricultural Policies Exacerbate Honeybee Pollination Service Supply-Demand Mismatches Across Europe. *PLoS ONE*, 9, e82996.

BROWN, R. M., WEGHORST, J. A., OLSON, K. V., DUYA, M. R. M., BARLEY, A. J., DUYA, M. V., SHEKELLE, M., NERI-ARBOLEDA, I., ESSELSTYN, J. A., DOMINY, N. J., ONG, P. S., MORITZ, G. L., LUCZON, A., DIESMOS, M. L. L., DIESMOS, A. C. & SILER, C. D. 2014. Conservation Genetics of the Philippine Tarsier: Cryptic Genetic Variation Restructures Conservation Priorities for an Island Archipelago Primate. *PLoS ONE*, 9, e104340.

BULL, J. J. 1981. Coevolution of Haplo-Diploidy and Sex Determination in the Hymenoptera. *Evolution*, 35, 568-580.

BURNEY, D. A., BURNEY, L. P., GODFREY, L. R., JUNGERS, W. L., GOODMAN, S. M., WRIGHT, H. T. & JULL, A. J. T. 2004. A chronology for late prehistoric Madagascar. *Journal of Human Evolution*, 47, 25-63.

CADET, L. J. T. 1980. La végétation de l'île de la Réunion: étude phytoécologique et phytosociologique. *Saint Denis de la Reunion: Imprimerie Cazal 312p. Illus., maps.. Includes plant lists. Geog*, 5.

CÁNOVAS, F., DE LA RÚA, P., SERRANO, J. & GALIÁN, J. 2011. Microsatellite variability reveals beekeeping influences on Iberian honeybee populations. *Apidologie,* 42, 235-251.

CARRECK, N. & WILLIAMS, I. 1998. The economic value of bees in the UK. *Bee World,* 79, 115-123.

CARRECK, N. L. 2008. Are honey bees (*Apis mellifera* L.) native to the British Isles? *Journal of Apicultural Research and Bee World,* 47, 318.

CASQUET, J., BOURGEOIS, Y. X., CRUAUD, C., GAVORY, F., GILLESPIE, R. G. & THÉBAUD, C. 2015. Community assembly on remote islands: a comparison of Hawaiian and Mascarene spiders. *Journal of Biogeography,* 42, 39-50.

CASTRO, L., AUSTIN, A. & DOWTON, M. 2002. Contrasting rates of mitochondrial molecular evolution in parasitic Diptera and Hymenoptera. *Molecular Biology and Evolution,* 19, 1100-1113.

CHAHBAR, N., MUÑOZ, I., DALL'OLIO, R., DE LA RÚA, P., SERRANO, J. & DOUMANDJI, S. 2013. Population structure of North African honey bees is influenced by both biological and anthropogenic factors. *Journal of Insect Conservation,* 17, 385-392.

CHAPMAN, N. C., HARPUR, B. A., LIM, J., RINDERER, T. E., ALLSOPP, M. H., ZAYED, A. & OLDROYD, B. P. 2015. A SNP test to identify Africanized honey bees via proportion of 'African' ancestry. *Molecular Ecology Resources,* n/a-n/a.

CHAPMAN, N. C., LIM, J. & OLDROYD, B. P. 2008. Population genetics of commercial and feral honey bees in Western Australia. *Journal of Economic Entomology,* 101, 272-277.

CHAPUIS, M.-P. & ESTOUP, A. 2007. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution,* 24, 621-631.

CHAUZAT, M. P., CAUQUIL, L., ROY, L., FRANCO, S., HENDRIKX, P. & RIBIERE-CHABERT, M. 2013. Demographics of the European apicultural industry. *PLoS ONE,* 8, e79018.

CHÁVEZ-GALARZA, J., HENRIQUES, D., JOHNSTON, J. S., CARNEIRO, M., RUFINO, J., PATTON, J. C. & PINTO, M. A. 2015. Revisiting the Iberian honey bee (Apis mellifera iberiensis) contact zone: maternal and genome-wide nuclear variation provide support for secondary contact from historical refugia. *Molecular Ecology.*

CHEKE, A. 2010. The timing of arrival of humans and their commensal animals on Western Indian Ocean oceanic islands. *Phelsuma,* 18, 38-69.

CHEKE, A. S. 2014. Speculation, statistics, facts and the Dodo's extinction date. *Historical Biology,* 27, 624-633.

CLARKE, K. E., RINDERER, T. E., FRANCK, P., QUEZADA-EUÁN, J. G. & OLDROYD, B. P. 2002. The Africanization of honeybees (*Apis mellifera* L.) of the Yucatan: a study of a massive hybridization event across time. *Evolution,* 56, 1462-74.

CLEGG, S. M. & PHILLIMORE, A. B. 2010. The influence of gene flow and drift on genetic and phenotypic divergence in two species of Zosterops in Vanuatu. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences,* 365, 1077-1092.

CLÉMENCET, J. 2006. *Evolution des stratégies de dispersion et de reproduction chez la fourmi Cataglyphis cursor.* Ph.D degree, Université Paris VI - Pierre et Marie Curie.

CLÉMENCET, J., AUBERT, C., BLOTTIÈRE, D. & SANCHEZ, M. 2013. Kleptoparasitism in the endemic gecko *Phelsuma inexpectata*: pollen theft from foraging honeybees on Réunion. *Journal of Tropical Ecology,* 29, 251-254.

COCKERELL, T. D. A. 1912. No. II.—HYMENOPTERA, APOIDEA. *Transactions of the Linnean Society of London. 2nd Series: Zoology,* 15, 29-41.

COFFIN, M. F. & RABINOWITZ, P. D. 1987. Reconstruction of Madagascar and Africa: evidence from the Davie fracture zone and western Somali basin. *Journal of Geophysical Research: Solid Earth (1978–2012),* 92, 9385-9406.

COLLET, T., FERREIRA, K. M., ARIAS, M. C., SOARES, A. E. & DEL LAMA, M. A. 2006. Genetic structure of Africanized honeybee populations (*Apis mellifera L.*) from Brazil and Uruguay viewed through mitochondrial DNA COI-COII patterns. *Heredity,* 97, 329-35.

CORNUET, J.-M. & GARNERY, L. 1991. Mitochondrial DNA variability in honeybees and its phylogeographic implications. *Apidologie,* 22, 627-642.

CORNUET, J.-M., GARNERY, L. & SOLIGNAC, M. 1991. Putative origin and function of the intergenic region between COI and COII of *Apis mellifera* L. mitochondrial DNA. *Genetics,* 128, 393-403.

CORNUET, J.-M., RAVIGNÉ, V. & ESTOUP, A. 2010. Inference on population history and model checking using DNA sequence and microsatellite data with the software DIYABC (v1. 0). *BMC Bioinformatics,* 11, 401.

CORNUET, J.-M., SANTOS, F., BEAUMONT, M. A., ROBERT, C. P., MARIN, J.-M., BALDING, D. J., GUILLEMAUD, T. & ESTOUP, A. 2008. Inferring population history with DIY ABC: a user-friendly approach to approximate Bayesian computation. *Bioinformatics,* 24, 2713-2719.

COROIAN, C. O., MUÑOZ, I., SCHLÜNS, E. A., PANITI-TELEKY, O. R., ERLER, S., FURDUI, E. M., MĂRGHITAŞ, L. A., DEZMIREAN, D. S., SCHLÜNS, H., DE LA

RÚA, P. & MORITZ, R. F. A. 2014. Climate rather than geography separates two European honeybee subspecies. *Molecular Ecology,* 23, 2353-2361.

COWIE, R. H. & HOLLAND, B. S. 2006. Dispersal is fundamental to biogeography and the evolution of biodiversity on oceanic islands. *Journal of Biogeography,* 33, 193-198.

CRANE, E. 1990. *Bees and beekeeping: science, practice and world resources,* Heinemann Newnes.

CRANE, E. 1999. *The world history of beekeeping and honey hunting,* Taylor & Francis.

CRAUL, M., CHIKHI, L., SOUSA, V., OLIVIERI, G. L., RABESANDRATANA, A., ZIMMERMANN, E. & RADESPIEL, U. 2009. Influence of forest fragmentation on an endangered large-bodied lemur in northwestern Madagascar. *Biological Conservation,* 142, 2862-2871.

CROZIER, R., CROZIER, Y. & MACKINLAY, A. 1989. The CO-I and CO-II region of honeybee mitochondrial DNA: evidence for variation in insect mitochondrial evolutionary rates. *Molecular Biology and Evolution,* 6, 399-411.

DABNEY, A., STOREY, J. D., QVALUE TUTORIAL, P. R. S., INSTALL, R., PACKAGES, I. B., PACKAGES, U. B., VIGNETTES, P., CLOUD, A. & TEAM, C. 2004. Q-value estimation for false discovery rate control. *Medicine,* 344, 539-548.

DALL'OLIO, R., MARINO, A., LODESANI, M. & MORITZ, R. F. A. 2007. Genetic characterization of Italian honeybees, *Apis mellifera ligustica,* based on microsatellite DNA polymorphisms. *Apidologie,* 38, 207-217.

DANFORTH, B. N., CARDINAL, S., PRAZ, C., ALMEIDA, E. A. & MICHEZ, D. 2013. The impact of molecular data on our understanding of bee phylogeny and evolution. *Annual Review of Entomology* 58, 57-78.

DANFORTH, B. N., SIPES, S., FANG, J. & BRADY, S. G. 2006. The history of early bee diversification based on five genes plus morphology. *Proceedings of the National Academic of Sciences USA,* 103, 15118-23.

DARWIN, C. 1859. *L'origine des espèces 1859,(6e édition), traduction d-Edmond Barbier, 1876,* Paris, Reinwald.

DE LA RÚA, P., GALIÁN, J., PEDERSEN, B. V. & SERRANO, J. 2006. Molecular characterization and population structure of *Apis mellifera* from Madeira and the Azores. *Apidologie,* 37, 699-708.

DE LA RÚA, P., GALIÁN, J., SERRANO, J. & MORITZ, R. F. A. 2001a. Genetic structure and distinctness of *Apis mellifera* L. populations from the Canary Islands. *Molecular Ecology,* 10, 1733-1742.

DE LA RÚA, P., GALIÁN, J., SERRANO, J. & MORITZ, R. F. A. 2001b. Molecular characterization and population structure of the honeybees from the Balearic islands (Spain). *Apidologie,* 32, 417-427.

DE LA RÚA, P., GALIÁN, J., SERRANO, J. & MORITZ, R. F. A. 2003. Genetic structure of Balearic honeybee populations based on microsatellite polymorphism. *Genetics Selection Evolution,* 35, 339-350.

DE LA RÚA, P., JAFFÉ, R., DALL'OLIO, R., MUÑOZ, I. & SERRANO, J. 2009. Biodiversity, conservation and current threats to European honeybees. *Apidologie,* 40, 263-284.

DE LA RÚA, P., JAFFÉ, R., MUÑOZ, I., SERRANO, J., MORITZ, R. F. A. & KRAUS, F. B. 2013. Conserving genetic diversity in the honeybee: comments on Harpur et al. (2012). *Molecular Ecology,* 22, 3208-3210.

DE LA RÚA, P., SERRANO, J. & GALIÁN, J. 1998. Mitochondrial DNA variability in the Canary Islands honeybees (*Apis mellifera* L.). *Molecular Ecology,* 7, 1543-1547.

DE LAMBALLERIE, X., LEROY, E., CHARREL, R. N., TTSETSARKIN, K., HIGGS, S. & GOULD, E. A. 2008. Chikungunya virus adapts to tiger mosquito via evolutionary convergence: a sign of things to come? *Virology journal,* 5, 33.

DE QUEIROZ, A. 2005. The resurrection of oceanic dispersal in historical biogeography. *Trends in Ecology & Evolution,* 20, 68-73.

DELANEY, D. A., MEIXNER, M. D., SCHIFF, N. M. & SHEPPARD, W. S. 2009. Genetic characterization of commercial honey bee (Hymenoptera: Apidae) populations in the United States by uising mitochondrial and microsatellite markers. *Annals of the Entomological Society of America,* 102, 666-673.

DELATTE, H., DAVID, P., GRANIER, M., LETT, J., GOLDBACH, R., PETERSCHMITT, M. & REYNAUD, B. 2006. Microsatellites reveal extensive geographical, ecological and genetic contacts between invasive and indigenous whitefly biotypes in an insular environment. *Genetical Research,* 87, 109-124.

DELATTE, H., HOLOTA, H., WARREN, B., BECKER, N., THIERRY, M. & REYNAUD, B. 2011. Genetic diversity, geographical range and origin of Bemisia tabaci (Hemiptera: Aleyrodidae) Indian Ocean Ms. *Bulletin of entomological research,* 101, 487-497.

DESALLE, R., FREEDMAN, T., PRAGER, E. M. & WILSON, A. C. 1987. Tempo and mode of sequence evolution in mitochondrial DNA of HawaiianDrosophila. *Journal of Molecular Evolution,* 26, 157-164.

DOUGLASS, K. & ZINKE, J. 2015. Forging ahead by land and by sea: Archaeology and paleoclimate reconstruction in Madagascar. *African Archaeological Review,* 32, 267-299.

EARL, D. A. & VONHOLDT, B. M. 2011. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources,* 4, 359-361.

EBERHARD, W. G. 1989. Niche expansion in the spider Wendilgarda galapagensis (Araneae, Theridiosomatidae) on Cocos Island. *Rev. Biol. Trop,* 37, 163-168.

EL-NIWEIRI, M. A. A. & MORITZ, R. F. A. 2010. The impact of apiculture on the genetic structure of wild honeybee populations (*Apis mellifera*) in Sudan. *Journal of Insect Conservation,* 14, 115-124.

EMERICK, C. & DUNCAN, R. 1982a. Age progressive volcanism in the Comores Archipelago, western Indian Ocean and implications for Somali plate tectonics. *Earth and Planetary Science Letters,* 60, 415-428.

EMERICK, C. M. & DUNCAN, R. A. 1982b. Age progressive volcanism in the Comores Archipelago, western Indian Ocean and implications for Somali plate tectonics. *Earth and Planetary Science Letters,* 60, 415-428.

EMERSON, B. 2002. Evolution on oceanic islands: molecular phylogenetic approaches to understanding pattern and process. *Molecular Ecology,* 11, 951-966.

ENGEL, M. S. 1999. The taxonomy of recent and fossil honey bees (Hymenoptera: Apidae; Apis). *Journal of Hymenoptera Research,* 8, 165-196.

ESTOUP, A., GARNERY, L., SOLIGNAC, M. & CORNUET, J.-M. 1995a. Microsatellite variation in honey bee (*Apis mellifera* L.) populations: hierarchical genetic structure and test of the infinite allele and stepwise mutation models. *Genetics,* 140, 679-695.

ESTOUP, A. & GUILLEMAUD, T. 2010. Reconstructing routes of invasion using genetic data: why, how and so what? *Molecular Ecology,* 19, 4113-4130.

ESTOUP, A., SOLIGNAC, M. & CORNUET, J.-M. 1994. Precise assessment of the number of patrilines and of genetic relatedness in honeybee colonies. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences,* 258, 1-7.

ESTOUP, A., TAILLIEZ, C., CORNUET, J.-M. & SOLIGNAC, M. 1995b. Size Homoplasy and Mutational Processes of Interrupted Microsatellites in 2 Bee Species, Apis-Mellifera and Bombus-Terrestris (Apidae). *Molecular Biology and Evolution,* 12, 1074-1084.

EVANNO, G., REGNAUT, S. & GOUDET, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular ecology,* 14, 2611-2620.

EVANS, J. D., SHEARMAN, D. C. A. & OLDROYD, B. P. 2004. Molecular basis of sex determination in haplodiploids. *Trends in Ecology & Evolution,* 19, 1-3.

EXCOFFIER, L., ESTOUP, A. & CORNUET, J.-M. 2005. Bayesian analysis of an admixture model with mutations and arbitrarily linked markers. *Genetics,* 169, 1727-1738.

FAO 1990. Beekeeping, Seychelles. Terminal statement. FAO, Rome (Italy). Agriculture Dept.

FAULQUIER, L., FONTAINE, R., VIDAL, E., SALAMOLARD, M. & LE CORRE, M. 2009. Feral Cats Felis catus Threaten the Endangered Endemic Barau's Petrel Pterodroma baraui at Reunion Island (Western Indian Ocean). *Waterbirds,* 32, 330-336.

FAURE, G. 2013. *Origin of igneous rocks: the isotopic evidence*, Springer Science & Business Media.

FAUVEL, A. A. 1909. *Unpublished Documents on the History of the Seychelles Islands Anterior to 1810*.

FERRANDO, A., MANUNZA, A., JORDANA, J., CAPOTE, J., PONS, A., PAIS, J., DELGADO, T., ATOCHE, P., CABRERA, B., MARTÍNEZ, A., LANDI, V., DELGADO, J. V., ARGÜELLO, A., VIDAL, O., LALUEZA-FOX, C., RAMÍREZ, O. & AMILLS, M. 2015. A mitochondrial analysis reveals distinct founder effect signatures in Canarian and Balearic goats. *Animal Genetics,* 46, 452-456.

FINGER, A., KETTLE, C., KAISER-BUNBURY, C., VALENTIN, T., MOUGAL, J. & GHAZOUL, J. 2012. Forest fragmentation genetics in a formerly widespread island endemic tree: Vateriopsis seychellarum (Dipterocarpaceae). *Molecular Ecology,* 21, 2369-2382.

FINGER, A., KETTLE, C. J., KAISER-BUNBURY, C. N., VALENTIN, T., DOUDEE, D., MATATIKEN, D. & GHAZOUL, J. 2011. Back from the brink: potential for genetic rescue in a critically endangered tree. *Molecular Ecology,* 20, 3773-3784.

FLETCHER, D. J. C. 1978. The African bee, *Apis mellifera adansonii*, in Africa. *Annual Review of Entomology,* 23, 151-171.

FLORENS, F. B. V., BAIDER, C., MARTIN, G. N. & STRASBERG, D. 2012. Surviving 370 years of human impact: what remains of tree diversity and structure of the lowland wet forests of oceanic island Mauritius? *Biodiversity and Conservation,* 21, 2139-2167.

FRANCISCO, A. P., VAZ, C., MONTEIRO, P. T., MELO-CRISTINO, J., RAMIREZ, M. & CARRIÇO, J. A. 2012. PHYLOViZ: phylogenetic inference and data visualization for sequence based typing methods. *BMC Bioinformatics,* 13, 87.

FRANCK, P. 1999. *Approche génétique des questions évolutives associées à la sociobiologie et à la phylogéographie de l'abeille domestique (Apis mellifera L.).* Ph.D, Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier.

FRANCK, P., GARNERY, L., CELEBRANO, G., SOLIGNAC, M. & CORNUET, J.-M. 2000a. Hybrid origins of honeybees from Italy (*Apis mellifera ligustica*) and Sicily (*A. m. sicula*). *Molecular Ecology,* 9, 907-921.

FRANCK, P., GARNERY, L., LOISEAU, A., OLDROYD, B. P., HEPBURN, H. R., SOLIGNAC, M. & CORNUET, J.-M. 2001. Genetic diversity of the honeybee in Africa: microsatellite and mitochondrial data. *Heredity,* 86, 420-430.

FRANCK, P., GARNERY, L., SOLIGNAC, M. & CORNUET, J.-M. 1998. The origin of West European subspecies of honeybees (*Apis mellifera*): new insights from microsatellite and mitochondrial data. *Evolution,* 52, 1119-1134.

FRANCK, P., GARNERY, L., SOLIGNAC, M. & CORNUET, J.-M. 2000b. Molecular confirmation of a fourth lineage in honeybees from the Near East. *Apidologie,* 31, 167-180.

FRANKHAM, R. 1997. Do island populations have less genetic variation than mainland populations? *Heredity,* 78, 311-327.

GALATAUD, J. 2015. Morphométrie de la nervation alaire : Un outil efficace pour identifier les différentes lignées génétiques et sous-espèces d'Apis mellifera présentes dans les îles du Sud-Ouest de l'océan Indien ? La Réunion: Université de La Réunion.

GALLAI, N., SALLES, J. M., SETTELE, J. & VAISSIERE, B. E. 2009. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecological Economics,* 68, 810-821.

GAO, H., WILLIAMSON, S. & BUSTAMANTE, C. D. 2007. A Markov chain Monte Carlo approach for joint inference of population structure and inbreeding rates from multilocus genotype data. *Genetics,* 176, 1635-1651.

GARNERY, L., CORNUET, J.-M. & SOLIGNAC, M. 1992. Evolutionary history of the honey bee *Apis mellifera* inferred from mitochondrial DNA analysis. *Molecular Ecology,* 1, 145-154.

GARNERY, L., FRANCK, P., BAUDRY, E., VAUTRIN, D., CORNUET, J.-M. & SOLIGNAC, M. 1998a. Genetic diversity of the west European honey bee (*Apis*

mellifera mellifera and *A. m. iberica*). I. Mitochondrial DNA. *Genetics Selection Evolution,* 30, S31-S47.

GARNERY, L., FRANCK, P., BAUDRY, E., VAUTRIN, D., CORNUET, J.-M. & SOLIGNAC, M. 1998b. Genetic diversity of the west European honey bee (*Apis mellifera mellifera* and *A. m. iberica*). II. Microsatellite loci. *Genetics Selection Evolution,* 30, S49-S74.

GARNERY, L., SOLIGNAC, M., CELEBRANO, G. & CORNUET, J.-M. 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., VAUTRIN, D., CORNUET, J.-M. & SOLIGNAC, M. 1991. Phylogenetic relathionships in the genus *Apis* inferred from mitochondrial DNA sequence data. *Apidologie,* 22, 87-92.

GERLACH, J. 2003. The biodiversity of the granitic islands of Seychelles. *Phelsuma Supplement,* 11, 1-47.

GERLACH, J. 2012. Red Listing reveals the true state of biodiversity: a comprehensive assessment of Seychelles biodiversity. *Phelsuma,* 20, 9-22.

GILLESPIE, R. G., BALDWIN, B. G., WATERS, J. M., FRASER, C. I., NIKULA, R. & RODERICK, G. K. 2012. Long-distance dispersal: a framework for hypothesis testing. *Trends in Ecology & Evolution,* 27, 47-56.

GIRARD, M. B., MATTILA, H. R. & SEELEY, T. D. 2011. Recruitment-dance signals draw larger audiences when honey bee colonies have multiple patrilines. *Insectes Sociaux,* 58, 77-86.

GODARD, A. & TABEAUD, M. 1998. Les climats. *Mécanismes et répartition. Armand Colin.*

GOODMAN, S. M. & BENSTEAD, J. P. 2005. Updated estimates of biotic diversity and endemism for Madagascar. *Oryx,* 39, 73-77.

GOUDET, J. 2001a. FSTAT 2.9. 3.2, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices. *See http://www2. unil. ch/popgen/softwares/fstat. htm.*

GOUDET, J. 2001b. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices version 2.9. 3.2, updated from Goudet 1995.

GOUDET, J. 2001c. FSTAT, version 2.9. 3, A program to estimate and test gene diversities and fixation indices. *Lausanne University, Lausanne, Switzerland.*

GRANT, P. R. & GRANT, B. R. 2002. Adaptive Radiation of Darwin's Finches: Recent data help explain how this famous group of Galápagos birds evolved, although gaps in our understanding remain. *American Scientist,* 90, 130-139.

GRUBER, K., SCHÖNING, C., OTTE, M., KINUTHIA, W. & HASSELMANN, M. 2013. Distinct subspecies or phenotypic plasticity? Genetic and morphological differentiation of mountain honey bees in East Africa. *Ecology and Evolution,* 3, 3204-3218.

GRUZA, G. V. 2002. *Environmental Structure and Function: Climate System, in Knowledge for sustainable development An insight into Encyclopedia of Life support systems Volume I,* Oxford, UK, UNESCO Publishing-Eolss Publishers.

HAJASH, A. & ARMSTRONG, R. L. 1972. Paleomagnetic and radiometric evidence for the age of the Comores Islands, west central Indian Ocean. *Earth and Planetary Science Letters,* 16, 231-236.

HAN, F., WALLBERG, A. & WEBSTER, M. T. 2012. From where did the Western honeybee (*Apis mellifera*) originate? *Ecology and Evolution,* 2, 1949-1957.

HANSEN, D. M., OLESEN, J. M. & JONES, C. G. 2002. Trees, birds and bees in Mauritius: exploitative competition between introduced honey bees and endemic nectarivorous birds? *Journal of Biogeography,* 29, 721-734.

HARPER, G. J., STEININGER, M. K., TUCKER, C. J., JUHN, D. & HAWKINS, F. 2007. Fifty years of deforestation and forest fragmentation in Madagascar. *Environmental Conservation,* 34, 325-333.

HARPUR, B. A., MINAEI, S., KENT, C. F. & ZAYED, A. 2012. Management increases genetic diversity of honey bees via admixture. *Molecular Ecology,* 21, 4414-4421.

HARPUR, B. A., MINAEI, S., KENT, C. F. & ZAYED, A. 2013. Admixture increases diversity in managed honey bees: Reply to De la Rúa et al.(2013). *Molecular Ecology,* 22, 3211-3215.

HAWLITSCHEK, O. & GLAW, F. 2013. The complex colonization history of nocturnal geckos (Paroedura) in the Comoros Archipelago. *Zoologica Scripta,* 42, 135-150.

HAWLITSCHEK, O., NAGY, Z. T. & GLAW, F. 2012. Island evolution and systematic revision of Comoran snakes: why and when subspecies still make sense. *PLoS One,* 7, e42970.

HAYAISHI, S. & KAWAMOTO, Y. 2006. Low genetic diversity and biased distribution of mitochondrial DNA haplotypes in the Japanese macaque (Macaca fuscata yakui) on Yakushima Island. *Primates,* 47, 158-164.

HEPBURN, H. R., JONES, G. E. & KIRBY, R. 1994. Introgression between A*pis mellifera capensis* Escholtz and *Apis mellifera scutellata* Lepeletier - the Sting Pheromones. *Apidologie,* 25, 557-565.

HEPBURN, H. R. & RADLOFF, S. E. 1998. *Honeybees of Africa*.

HEPBURN, H. R., RADLOFF, S. E. & FUCHS, S. 1998. Population structure and the interface between *Apis mellifera capensis* and *Apis mellifera scutellata*. *Apidologie,* 29, 333-346.

HERMANN, P. 1920. Apiculture pratique aux colonies tropicales.

HERRIDGE, V. L. & LISTER, A. M. 2012. Extreme insular dwarfism evolved in a mammoth. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences,* 279, 3193-3200.

HUME, J. P. 2005. Contrasting taphofacies in ocean island settings: the fossil record of Mascarene vertebrates. *Monografies de la Societat d'Història Natural de les Balears,* 12, 129-144.

HURLES, M. E., SYKES, B. C., JOBLING, M. A. & FORSTER, P. 2005. The Dual Origin of the Malagasy in Island Southeast Asia and East Africa: Evidence from Maternal and Paternal Lineages. *The American Journal of Human Genetics,* 76, 894-901.

HUSSEIN, M. H. Beekeeping in Africa: II-Central, Southern African countries and Islands. *In:* APIMONDIA, ed. 37th International Apicultural Congress,, 2001 Durban, South Africa.

IGAWA, T., OUMI, S., KATSUREN, S. & SUMIDA, M. 2013. Population structure and landscape genetics of two endangered frog species of genus Odorrana: different scenarios on two islands. *Heredity,* 110, 46-56.

ILYASOV, R. A., KUTUEV, I. A., PETUKHOV, A. V. & POSKRYAKOV, A. V. 2011. Phylogenetic relationships of dark European honeybees *Apis mellifera mellifera* L. from the Russian Ural and West European populations. *Journal of Apicultural Science,* 55, 67-76.

IMPEY, A. J., CÔTÉ, I. M. & JONES, C. G. 2002. Population recovery of the threatened endemic Rodrigues fody (Foudia flavicans) (Aves, Ploceidae) following reforestation. *Biological Conservation,* 107, 299-305.

JACQUARD, C., VIRGILIO, M., DAVID, P., QUILICI, S., DE MEYER, M. & DELATTE, H. 2013. Population structure of the melon fly, Bactrocera cucurbitae, in Reunion Island. *Biological Invasions,* 15, 759-773.

JAKOBSSON, M. & ROSENBERG, N. A. 2007. CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics,* 23, 1801-1806.

JENSEN, A. B., PALMER, K. A., BOOMSMA, J. J. & PEDERSEN, B. V. 2005a. Varying degrees of *Apis mellifera ligustica* introgression in protected populations of the black honeybee, *Apis mellifera mellifera*, in northwest Europe. *Molecular Ecology,* 14, 93-106.

JENSEN, A. B., PALMER, K. A., CHALINE, N., RAINE, N. E., TOFILSKI, A., MARTIN, S. J., PEDERSEN, B. V., BOOMSMA, J. J. & RATNIEKS, F. L. 2005b. Quantifying honey bee mating range and isolation in semi-isolated valleys by DNA microsatellite paternity analysis. *Conservation Genetics,* 6, 527-537.

JHUMUN, G. 2011. Report on Honeybees from Mauritius for OIE conference (Regional Training Seminar on Diseases of Honey Bees for OIE National Focal Points for Animal Disease Notification). *In:* MINISTRY OF AGRO INDUSTRY & FOOD SECURITY, M. (ed.) *OIE Ezulwini.* Swaziland: Ministry of Agro Industry & Food Security.

JOMBART, T. 2008. adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics,* 24, 1403-1405.

JORGENSEN, T. H. & OLESEN, J. M. 2001. Adaptive radiation of island plants: evidence from Aeonium (Crassulaceae) of the Canary Islands. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics,* 4, 29-42.

KAISER-BUNBURY, C. N., MEMMOTT, J. & MÜLLER, C. B. 2009. Community structure of pollination webs of Mauritian heathland habitats. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics,* 11, 241-254.

KAISER-BUNBURY, C. N., TRAVESET, A. & HANSEN, D. M. 2010. Conservation and restoration of plant–animal mutualisms on oceanic islands. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics,* 12, 131-143.

KAISER-BUNBURY, C. N., VALENTIN, T., MOUGAL, J., MATATIKEN, D. & GHAZOUL, J. 2011. The tolerance of island plant-pollinator networks to alien plants. *Journal of Ecology,* 99, 202-213.

KAISER-BUNBURY, C. N., VALENTIN, T., MOUGAL, J., MATATIKEN, D. & GHAZOUL, J. 2011. The tolerance of island plant–pollinator networks to alien plants. *Journal of Ecology,* 99, 202-213.

KAISER, C. N. 2006. *Functional integrity of plant–pollinator communities in restored habitats in Mauritius.* Universität Zürich.

KALINOWSKI, S. T. 2005. hp-rare 1.0: a computer program for performing rarefaction on measures of allelic richness. *Molecular Ecology Notes,* 5, 187-189.

KANDEMIR, İ., KENCE, M. & KENCE, A. 2000. Genetic and morphometric variation in honeybee (*Apis mellifera* L.) populations of Turkey. *Apidologie,* 31, 343-356.

KANDEMIR, İ., KENCE, M., SHEPPARD, W. S. & KENCE, A. 2006. Mitochondrial DNA variation in honey bee (*Apis mellifera* L.) populations from Turkey. *Journal of Apicultural Research and Bee World,* 45, 33-38.

KANDEMIR, İ., ÖZKAN, A. & FUCHS, S. 2011. Reevaluation of honeybee (*Apis mellifera*) microtaxonomy: a geometric morphometric approach. *Apidologie,* 42, 618-627.

KIER, G., KREFT, H., LEE, T. M., JETZ, W., IBISCH, P. L., NOWICKI, C., MUTKE, J., BARTHLOTT, W. & CRANE, P. R. 2009. A Global Assessment of Endemism and Species Richness across Island and Mainland Regions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* 106, 9322-9327.

KITSON, J. J. N. 2012. *Speciation and diversification of the beetle tribe Cratopini on the islands of the South West Indian Ocean area.* Doctor of Philosophy, University of East Anglia, UK.

KLATT, B. K., HOLZSCHUH, A., WESTPHAL, C., CLOUGH, Y., SMIT, I., PAWELZIK, E. & TSCHARNTKE, T. 2014. Bee pollination improves crop quality, shelf life and commercial value. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences,* 281, 20132440.

KLEIN, A. M., VAISSIERE, B. E., CANE, J. H., STEFFAN-DEWENTER, I., CUNNINGHAM, S. A., KREMEN, C. & TSCHARNTKE, T. 2007. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences,* 274, 303-13.

KLINGER, C. 2009. Même les abeilles sauvages déclinent. *La Recherche,* 65-67.

KOENIGER, G., KOENIGER, N. & FABRITIUS, M. 1979. Some detailed observations of mating in the honeybee. *Bee World.*

KONO, Y. & KOHN, J. R. 2015. Range and Frequency of Africanized Honey Bees in California (USA). *PLoS ONE,* 10, e0137407.

KOOP, J. A. H., DEMATTEO, K. E., PARKER, P. G. & WHITEMAN, N. K. 2014. Birds are islands for parasites. *Biology Letters,* 10.

KOTTHOFF, U., WAPPLER, T. & ENGEL, M. S. 2013. Greater past disparity and diversity hints at ancient migrations of European honey bee lineages into Africa and Asia. *Journal of Biogeography,* 40, 1832-1838.

KUNTNER, M. & AGNARSSON, I. 2011. Phylogeography of a successful aerial disperser: the golden orb spider Nephila on Indian Ocean islands. *BMC Evolutionary Biology,* 11, 119.

KUSUMA, P., COX, M. P., PIERRON, D., RAZAFINDRAZAKA, H., BRUCATO, N., TONASSO, L., SURYADI, H. L., LETELLIER, T., SUDOYO, H. & RICAUT, F.-X. 2015. Mitochondrial DNA and the Y chromosome suggest the settlement of Madagascar by Indonesian sea nomad populations. *BMC Genomics,* 16, 191.

LANG, B. F., GRAY, M. W. & BURGER, G. 1999. Mitochondrial genome evolution and the origin of eukaryotes. *Annual Review of Genetics,* 33, 351-397.

LANGELLA, O. 2002. Populations, a free population genetic software. *URL http://www. legs. cnrs-gif. fr.*

LATREILLE, P. A. 1804. Notice des espèces d'abeilles vivant en grande sociétée, ou d'abeilles proprement dites, et description d'espèces nouvelles. *Annales du Muséum National d'Histoire Naturelle,* 5, 161-178.

LE CONTE, Y. & NAVAJAS, M. 2008. Climate change: impact on honey bee populations and diseases. *Revue Scientifique et Technique,* 27, 485-97.

LE PÉCHON, T. 2009. *Systématique des dombeyoideae (Malvaceae, ex-" Sterculiaceae") des Mascareignes: approches morphologique et moléculaire.* Paris 6.

LE PÉCHON, T., BAIDER, C., GIGORD, L. D. B., HAEVERMANS, A. & DUBUISSON, J.-Y. 2011. Dombeya sevathianii (Malvaceae): A new critically endangered species endemic to Mauritius (Indian Ocean). *Phytotaxa,* 24, 1-10.

LE PÉCHON, T., DUBUISSON, J.-Y., HAEVERMANS, T., CRUAUD, C., COULOUX, A. & GIGORD, L. D. 2010. Multiple colonizations from Madagascar and converged acquisition of dioecy in the Mascarene Dombeyoideae (Malvaceae) as inferred from chloroplast and nuclear DNA sequence analyses. *Annals of Botany,* 106, 343-357.

LE PÉCHON, T., SANCHEZ, M., HUMEAU, L., GIGORD, L. D. & ZHANG, L.-B. 2013. Vertebrate pollination of the endemic Trochetia granulata (Malvaceae) on Réunion. *Journal of Tropical Ecology,* 29, 353-356.

LIONNET, J. F. 1984. Observations d'histoire naturelle faites aux Seychelles en 1768 au cours de l'expédition Marion-Dufresne. *Mauritius Inst. Bull.,* 10, 15-73.

MACARTHUR, R. H. & WILSON, E. O. 1967. *The theory of island biogeography,* Princeton University Press.

MAGNANOU, E. 2005. *Micromammifères, helminthes et insularité : évolution des traits d'histoire de vie du rat noir (Muridae) et de deux musaraignes (Crocidurinae) sur les îles ouest-méditerranéennes.*

MAGNUS, R. M. & SZALANSKI, A. L. 2010. Genetic evidence for honey bees (*Apis mellifera* L.) of Middle Eastern lineage in the United States. *Sociobiology,* 55, 285-296.

MAGNUS, R. M., TRIPODI, A. D. & SZALANSKI, A. L. 2011. Mitochondrial DNA diversity of honey bees, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) from queen breeders in the United States. *Journal of Apicultural Science,* 55, 37-46.

MAGNUS, R. M., TRIPODI, A. D. & SZALANSKI, A. L. 2014. Mitochondrial DNA diversity of honey bees (*Apis mellifera*) from unmanaged colonies and swarms in the United States. *Biochemical Genetics,* 1-13.

MALLET, B. 2014. *Rôle des facteurs écologiques dans le processus de spéciation en milieu insulaire. Effet de l'habitat et des pollinisateurs sur la diversification du faham (Jumellea spp., Orchidaceae) aux Mascareignes.*

MATTILA, H. R. & SEELEY, T. D. 2007. Genetic Diversity in Honey Bee Colonies Enhances Productivity and Fitness. *Science,* 317, 362-364.

MCDOUGALL, I. 1971. The geochronology and evolution of the young volcanic island of Réunion, Indian Ocean. *Geochimica et Cosmochimica Acta,* 35, 261-288.

MCDOUGALL, I. & CHAMALAUN, F. 1969. Isotopic dating and geomagnetic polarity studies on volcanic rocks from Mauritius, Indian Ocean. *Geological Society of America Bulletin,* 80, 1419-1442.

MCDOUGALL, I., UPTON, B. & WADSWORTH, W. 1965. A geological reconnaissance of Rodriguez island, Indian ocean.

MEEUS, S., JACQUEMYN, H., HONNAY, O. & PAILLER, T. 2011. Self-incompatibility and pollen limitation in the rare tristylous endemic Hugonia serrata on La Réunion Island. *Plant Systematics and Evolution,* 292, 143-151.

MEIRI, S., RAIA, P. & PHILLIMORE, A. B. 2011. Slaying dragons: limited evidence for unusual body size evolution on islands. *Journal of Biogeography,* 38, 89-100.

MEIXNER, M. D., COSTA, C., KRYGER, P., HATJINA, F., BOUGA, M., IVANOVA, E. N. & BÜCHLER, R. 2010. Conserving diversity and vitality for honey bee breeding. *Journal of Apicultural Research,* 49, 85-92.

MEIXNER, M. D., LETA, M. A., KOENIGER, N. & FUCHS, S. 2011. The honey bees of Ethiopia represent a new subspecies of *Apis mellifera—Apis mellifera simensis* n. ssp. *Apidologie,* 42, 425-437.

MEIXNER, M. D., PINTO, M. A., BOUGA, M., KRYGER, P., IVANOVA, E. & FUCHS, S. 2013. Standard methods for characterising subspecies and ecotypes of *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Research,* 52, 1-27.

MEIXNER, M. D., RUTTNER, F., KOENIGER, N. & KOENIGER, G. 1989. The mountain bees of the Kilimanjaro region and their relation to neighbouring bee populations. *Apidologie,* 20, 165-174.

MEIXNER, M. D., WOROBIK, M., WILDE, J., FUCHS, S. & KOENIGER, N. 2007. *Apis mellifera mellifera* in eastern Europe—morphometric variation and determination of its range limits. *Apidologie,* 38, 191-197.

MICHAUX, J. R., BELLOCQ, D., GOÜY, J., SARÀ, M. & MORAND, S. 2002. Body size increase in insular rodent populations: a role for predators? *Global Ecology and Biogeography,* 11, 427-436.

MICHENEAU, C., CARLSWARD, B. S., FAY, M. F., BYTEBIER, B., PAILLER, T. & CHASE, M. W. 2008. Phylogenetics and biogeography of Mascarene angraecoid orchids (Vandeae, Orchidaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution,* 46, 908-922.

MICHENER, C. D. 1975. The Brazilian bee problem. *Annual Review of Entomology,* 20, 399-416.

MICHENER, C. D. 2000. *The bees of the world,* JHU Press.

MICHON, L. *in press.,. The volcanism of the Comores archipelago integrated at a recgional scale,* Springer.

MIDWAY, S. R. & HODGE, A.-M. C. 2012. Carlquist revisited: history, success, and applicability of a natural history model. *Biology & Philosophy,* 27, 497-520.

MIGUEL, I., IRIONDO, M., GARNERY, L., SHEPPARD, W. S. & ESTONBA, A. 2007. Gene flow within the M evolutionary lineage of Apis mellifera: role of the Pyrenees, isolation by distance and post-glacial re-colonization routes in the western Europe. *Apidologie,* 38, 141-155.

MILÁ, B., WARREN, B. H., HEEB, P. & THÉBAUD, C. 2010. The geographic scale of diversification on islands: genetic and morphological divergence at a very small spatial scale in the Mascarene grey white-eye (Aves: Zosterops borbonicus). *BMC Evolutionary Biology,* 10, 158.

MITTERMEIER, R. A., TURNER, W. R., LARSEN, F. W., BROOKS, T. M. & GASCON, C. 2011. Global biodiversity conservation: the critical role of hotspots. *Biodiversity hotspots.* Springer.

MONTAGGIONI, L. 1976. Histoire géologique des récifs coralliens de l 'archipel des Mascareignes. *Biologie marine et exploitation des ressources de l 'océan Indien occidental. ORSTOM, Paris, Travaux et Documents de l 'ORSTOM,* 47, 113-128.

MONTAGGIONI, L. & NOUGIER, J. 1981. Clastic rock inclusions in volcanos of Anjouan (Comores Archipelago)-origin and significance in the evolution of the Mozambique Channel. *Bulletin de la Société Geologique de France,* 23, 595-601.

MOORE, J., WHITE, W. M., PAUL, D., DUNCAN, R. A., ABOUCHAMI, W. & GALER, S. J. 2011. Evolution of shield-building and rejuvenescent volcanism of Mauritius. *Journal of Volcanology and Geothermal Research,* 207, 47-66.

MOURE, J. S., URBAN, D. & MELO, G. A. 2007. *Catalogue of bees (Hymenoptera, Apoidea) in the neotropical region,* Sociedade Brasileira de Entomologia Curitiba.

MOURER-CHAUVIRÉ, C. & MOUTOU, F. 1987. Découverte d'une forme récemment éteinte d'ibis endémique insulaire de l'île de la Réunion: Borbonilis latipes n. gen.

n. sp. *Comptes rendus de l'Académie des sciences. Série 2, Mécanique, Physique, Chimie, Sciences de l'univers, Sciences de la Terre,* 305, 419-423.

MULI, E., PATCH, H., FRAZIER, M., FRAZIER, J., TORTO, B., BAUMGARTEN, T., KILONZO, J., MUMOKI, F., MASIGA, D. & TUMLINSON, J. 2014. Evaluation of the distribution and impacts of parasites, pathogens, and pesticides on honey bee (*Apis mellifera*) populations in East Africa. *PLoS ONE,* 9, e94459.

MUÑOZ, I., DALL'OLIO, R., LODESANI, M. & DE LA RÚA, P. 2009. Population genetic structure of coastal Croatian honeybees (*Apis mellifera carnica*). *Apidologie,* 40, 617-626.

MUÑOZ, I. & DE LA RÚA, P. 2012. Temporal analysis of the genetic diversity in a honey bee mating area of an island population (La Palma, Canary Islands, Spain). *Journal of Apicultural Science,* 56, 41-49.

MUÑOZ, I., HENRIQUES, D., JOHNSTON, J. S., CHÁVEZ-GALARZA, J., KRYGER, P. & PINTO, M. A. 2015. Reduced SNP Panels for Genetic Identification and Introgression Analysis in the Dark Honey Bee (<italic>Apis mellifera mellifera</italic>). *PLoS ONE,* 10, e0124365.

MUÑOZ, I., LODESANI, M. & DE LA RÚA, P. 2014a. Estimating introgression in *Apis mellifera siciliana* populations: are the conservation islands really effective? *Insect Conservation and Diversity,* 7, 563-571.

MUÑOZ, I., MADRID-JIMENEZ, M. J. & DE LA RÚA, P. 2012a. Temporal genetic analysis of an introgressed island honey bee population (Tenerife, Canary Islands, Spain). *Journal of Apicultural Research,* 51, 144-146.

MUÑOZ, I., PINTO, M. A. & DE LA RÚA, P. 2013. Temporal changes in mitochondrial diversity highlights contrasting population events in Macaronesian honey bees. *Apidologie,* 1-11.

MUÑOZ, I., PINTO, M. A. & DE LA RÚA, P. 2014b. Effects of queen importation on the genetic diversity of Macaronesian island honey bee populations (*Apis mellifera* Linneaus 1758). *Journal of Apicultural Research,* 53, 296-302.

MUÑOZ, I., STEVANOVIC, J., STANIMIROVIC, Z. & DE LA RÚA, P. 2012b. Genetic variation of *Apis mellifera* from Serbia inferred from mitochondrial analysis. *Journal of Apicultural Science,* 56, 59-69.

MYERS, N., MITTERMEIER, R. A., MITTERMEIER, C. G., DA FONSECA, G. A. B. & KENT, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature,* 403, 853-858.

NEI, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics,* 89, 583-590.

NEI, M., TAJIMA, F. & TATENO, Y. 1983. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. *Journal of Molecular Evolution,* 19, 153-170.

NORTH-COOMBES, A. 1971. *The island of Rodrigues*, Mauritius, Published by the author, with the assistance of the Mauritius Advertising Bureau.

NOUGIER, J., CANTAGREL, J. & KARCHE, J. 1986. The Comores archipelago in the western Indian Ocean: volcanology, geochronology and geodynamic setting. *Journal of African Earth Sciences (1983),* 5, 135-144.

O'DOWD, D. J., GREEN, P. T. & LAKE, P. S. 2003. Invasional 'meltdown' on an oceanic island. *Ecology Letters,* 6, 812-817.

OLDROYD, B. P. 2007. What's killing American honey bees? *PLoS Biology,* 5, e168.

OLEKSA, A., CHYBICKI, I., TOFILSKI, A. & BURCZYK, J. 2011. Nuclear and mitochondrial patterns of introgression into native dark bees (*Apis mellifera mellifera*) in Poland. *Journal of Apicultural Research,* 50, 116-129.

OLESEN, J. M. & VALIDO, A. 2003. Lizards as pollinators and seed dispersers: an island phenomenon. *Trends in Ecology & Evolution,* 18, 177-181.

PAFILIS, P., MEIRI, S., FOUFOPOULOS, J. & VALAKOS, E. 2009. Intraspecific competition and high food availability are associated with insular gigantism in a lizard. *Naturwissenschaften,* 96, 1107-1113.

PAGE JR, R. E. & PENG, C. Y. S. 2001. Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera* L. *Experimental Gerontology,* 36, 695-711.

PAILLER, T., MAURICE, S. & THOMPSON, J. D. 2002. Pollen transfer patterns in a distylous plant with overlapping pollen-size distributions. *OIKOS,* 99, 308-316.

PAILLER, T. & THOMPSON, J. D. 1997. Distyly and variation in heteromorphic incompatibility in Gaertnera vaginata (Rubiaceae) endemic to La Reunion Island. *American Journal of Botany,* 84, 315-315.

PALMER, K. A. & OLDROYD, B. P. 2000. Evolution of multiple mating in the genus Apis. *Apidologie,* 31, 235-248.

PEDERSEN, B. V. 2001. Identification of honeybees from Cape Verde. *Beekeeping and Development,* 60.

PIMM, S. L. 1984. The complexity and stability of ecosystems. *Nature,* 307, 321-326.

PIMM, S. L., RUSSELL, G. J., GITTLEMAN, J. L. & BROOKS, T. M. 1995. The future of biodiversity. *Science-AAAS-Weekly Paper Edition,* 269, 347-349.

PINTO, M. A., HENRIQUES, D., CHÁVEZ-GALARZA, J., KRYGER, P., GARNERY, L., VAN DER ZEE, R., DAHLE, B., SOLAND-RECKEWEG, G., DE LA RÚA, P., DALL'OLIO, R., CARRECK, N. L. & JOHNSTON, J. S. 2014. Genetic integrity of the Dark European honey bee (*Apis mellifera mellifera*) from protected

populations: a genome-wide assessment using SNPs and mtDNA sequence data. *Journal of Apicultural Research,* 53, 269-278.

PINTO, M. A., MUÑOZ, I., CHÁVEZ-GALARZA, J. & DE LA RÚA, P. 2012. The Atlantic side of the Iberian Peninsula: a hot-spot of novel African honey bee maternal diversity. *Apidologie*, 1-11.

PLUMMER, P. S. & BELLE, E. 1995. Mesozoic tectono-stratigraphic evolution of the Seychelles microcontinent. *Sedimentary Geology,* 96, 73-91.

PONS, O. & CHAOUCHE, K. 1995. Estimation, variance and optimal sampling of gene diversity II. Diploid locus. *Theoretical and Applied Genetics,* 91, 122-130.

PRICE, M. N., DEHAL, P. S. & ARKIN, A. P. 2009. FastTree: computing large minimum evolution trees with profiles instead of a distance matrix. *Molecular Biology and Evolution,* 26, 1641-1650.

PRITCHARD, J. K., STEPHENS, M. & DONNELLY, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics,* 155, 945-959.

PRODON, R., THIBAULT, J.-C. & DEJAIFVE, P.-A. 2002. Expansion vs. compression of bird altitudinal ranges on a Mediterranean island. *Ecology,* 83, 1294-1306.

QUAMMEN, D. 1996. The song of the dodo: island biogeography in an age of extinction. *Hutchinson, London.*

RABINOWITZ, P. D., COFFIN, M. F. & FALVEY, D. 1983. The separation of Madagascar and Africa. *Science,* 220, 67-69.

RADLOFF, S. E., HEPBURN, H. R., HEPBURN, C. & DE LA RÚA, P. 2001. Morphometric affinities and population structure of honey bees of the Balearic Islands (Spain). *Journal of Apicultural Research,* 40, 97-103.

RADTKEY, R. R. 1996. Adaptive radiation of day-geckos (Phelsuma) in the Seychelles archipelago: a phylogenetic analysis. *Evolution*, 604-623.

RALALAHARISOA-RAMAMONJISOA, Z., RALIMANANAI, H. & LOBREAU-CALLEN, D. 1996. Comportement de butinage d'Apis mellifera var unicolor (Hymenoptera, Apidae) dans divers biotopes. *Biogéographie de Madagascar*, 517-522.

RAMASAMY, R. K., RAMASAMY, S., BINDROO, B. B. & NAIK, V. G. 2014. STRUCTURE PLOT: a program for drawing elegant STRUCTURE bar plots in user friendly interface. *SpringerPlus,* 3, 431.

RASOLOFOARIVAO, H., CLÉMENCET, J., RAVAOMANARIVO, L. H. R., RAZAFINDRAZAKA, D., REYNAUD, B. & DELATTE, H. 2013. Spread and strain determination of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) in Madagascar since its first report in 2010. *Experimental & Applied Acarology*, 1-10.

RASOLOFOARIVAO, H., CLÉMENCET, J., RAVELOSON RAVAOMANARIVO, L. H., REYNAUD, B., TECHER, M. A. & DELATTE, H. submitted. Genetic diversity of the endemic honeybee: *Apis mellifera unicolor* (Hymenoptera: Apidae) from Madagascar. *Apidologie*.

RASOLOFOARIVAO, H., CLÉMENCET, J., TECHER, M. A., RAVAOMANARIVO, L. H. R., REYNAUD, B. & DELATTE, H. 2015. Genetic diversity of the endemic honeybee: *Apis mellifera unicolor* (Hymenoptera: Apidae) in Madagascar. *Apidologie*, 1-13.

RAXWORTHY, C. J., FORSTNER, M. R. J. & NUSSBAUM, R. A. 2002. Chameleon radiation by oceanic dispersal. *Nature*, 415, 784-787.

RAYMOND, M. & ROUSSET, F. 2004. GENEPOP version 3.4. *Population genetics software for exact tests and ecumenicism. Montpellier, France, Laboratoire de Genetique et Environment*.

REHM, S. M. 1988. Report on the consultancy on bee diseases (Mauritius and Rodrigues). United nations development promgramme.

RHYMER, J. M. & SIMBERLOFF, D. 1996. Extinction by hybridization and introgression. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 83-109.

RIST, L., KAISER-BUNBURY, C. N., FLEISCHER-DOGLEY, F., EDWARDS, P., BUNBURY, N. & GHAZOUL, J. 2010. Sustainable harvesting of coco de mer, Lodoicea maldivica, in the Vallée de Mai, Seychelles. *Forest Ecology and Management*, 260, 2224-2231.

RIVERA-MARCHAND, B., OSKAY, D. & GIRAY, T. 2012. Gentle Africanized bees on an oceanic island. *Evolutionary Applications*, 5, 746-756.

ROCHA, S., CARRETERO, M. A. & HARRIS, D. J. 2005. Mitochondrial DNA sequence data suggests two independent colonizations of the Comoros archipelago by chameleons of the genus Furcifer. *Belgian journal of zoology*, 135, 39.

RÖDL, T., BERGER, S., ROMERO, L. M. & WIKELSKI, M. 2007. Tameness and stress physiology in a predator-naive island species confronted with novel predation threat. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 274, 577-582.

ROMERO, L. M. & WIKELSKI, M. 2010. Stress physiology as a predictor of survival in Galapagos marine iguanas. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 277, 3157-3162.

RORTAIS, A., ARNOLD, G., ALBURAKI, M., LEGOUT, H. & GARNERY, L. 2011. Review of the DraI COI-COII test for the conservation of the black honeybee (*Apis mellifera mellifera*). *Conservation Genetics Resources*, 3, 383-391.

ROSENBERG, N. A. 2004. DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes,* 4, 137-138.

RUNEMARK, A., BRYDEGAARD, M. & SVENSSON, E. I. 2014. Does relaxed predation drive phenotypic divergence among insular populations? *Journal of Evolutionary Biology,* 27, 1676-1690.

RUNEMARK, A., SAGONAS, K. & SVENSSON, E. I. 2015. Ecological explanations to island gigantism: dietary niche divergence, predation, and size in an endemic lizard. *Ecology,* 96, 2077-2092.

RUTTNER, F. 1988. *Biogeography and taxonomy of honeybees,* Verlag, Springer.

RUTTNER, F., PATERSON, P. D. & ROBERTSON, A. 1993. Epistolary correspondence referenced for the "(SEY/90/F01) Employement generation project: importation of bees". *In:* MINISTRY OF AGRICULTURE AND FISHERIES (ed.). Seychelles.

RUTTNER, F., TASSENCOURT, L. & LOUVEAUX, J. 1978. Biometrical-statistical analysis of the geographic variability of Apis mellifera L. *Apidologie,* 9, 363-381.

SALGUEIRO, P., COELHO, M. M., PALMEIRIM, J. M. & RUEDI, M. 2004. Mitochondrial DNA variation and population structure of the island endemic Azorean bat (Nyctalus azoreum). *Molecular ecology,* 13, 3357-3366.

SALGUEIRO, P., RUEDI, M., COELHO, M. & PALMEIRIM, J. 2007. Genetic divergence and phylogeography in the genus Nyctalus (Mammalia, Chiroptera): implications for population history of the insular bat Nyctalus azoreum. *Genetica,* 130, 169-181.

SALMONA, J., SALAMOLARD, M., FOUILLOT, D., GHESTEMME, T., LAROSE, J., CENTON, J.-F., SOUSA, V., DAWSON, D. A., THEBAUD, C. & CHIKHI, L. 2012. Signature of a pre-human population decline in the critically endangered Reunion Island endemic forest bird Coracina newtoni. *PLoS ONE,* 7, e43524.

SAMONDS, K. E., GODFREY, L. R., ALI, J. R., GOODMAN, S. M., VENCES, M., SUTHERLAND, M. R., IRWIN, M. T. & KRAUSE, D. W. 2012. Spatial and temporal arrival patterns of Madagascar's vertebrate fauna explained by distance, ocean currents, and ancestor type. *Proceedings of the National Academy of Sciences,* 109, 5352-5357.

SAMWAYS, M., HITCHINS, P., BOURQUIN, O. & HENWOOD, J. 2010. *Tropical Island Recovery: Cousine Island, Seychelles,* Wiley.

SANCHEZ, M. & PROBST, J.-M. 2011. Distribution and conservation status of the Manapany day gecko, Phelsuma inexpectata MERTENS, 1966, an endemic threatened reptile from Réunion Island (Squamata: Gekkonidae). *Cahiers scientifiques de l'océan Indien occidental,* 2.

SAVIDGE, J. A. 1987. Extinction of an island forest avifauna by an introduced snake. *Ecology,* 68, 660-668.

SAVOLAINEN, O., LASCOUX, M. & MERILÄ, J. 2013. Ecological genomics of local adaptation. *Nature Reviews Genetics,* 14, 807-820.

SAX, D. F. & GAINES, S. D. 2008. Species invasions and extinction: the future of native biodiversity on islands. *Proceedings of the National Academy of Sciences,* 105, 11490-11497.

SCHLÜNS, H., MORITZ, R. F. A., NEUMANN, P., KRYGER, P. & KOENIGER, G. 2005. Multiple nuptial flights, sperm transfer and the evolution of extreme polyandry in honeybee queens. *Animal Behaviour,* 70, 125-131.

SCHNEIDER, F. 1989. *Biométrie des abeilles réunionnaises.* Veterinary Ph.D, Ecole nationale vétérinaire d'Alfort.

SCHUMACHER, M. J., SCHMIDT, J. O. & EGEN, N. B. 1989. Lethality of 'killer' bee stings. *Nature,* 337, 413-413.

SEELEY, T. D. 2009. *The wisdom of the hive: the social physiology of honey bee colonies*, Harvard University Press.

SENTERRE, B. & WAGNER, M. 2014. Mapping Seychelles habitat-types on Mahé, Praslin, Silhouette, La Digue and Curieuse, Consultancy Report, Government of Seychelles, United Nations Development Programme. *In:* SEYCHELLES, G. O. (ed.). Victoria, Seychelles.

SEWALL, B. J., GRANEK, E. F. & TREWHELLA, W. J. 2003. The endemic Comoros Islands fruit bat Rousettus obliviosus: ecology, conservation, and Red List status. *Oryx,* 37, 344-352.

SEYCHELLES DEPARTEMENT OF AGRICULTURE 1918. *Annual Report of the Department of Agriculture*, U.S. Government Printing Office.

SEYCHELLES DEPARTEMENT OF AGRICULTURE 1949. *Annual Report of the Department of Agriculture*, U.S. Government Printing Office.

SHAIBI, T., LATTORFF, H. M. G. & MORITZ, R. F. A. 2008. A microsatellite DNA toolkit for studying population structure in *Apis mellifera*. *Molecular Ecology Resources,* 8, 1034-1036.

SHAIBI, T. & MORITZ, R. F. A. 2010. 10,000 years in isolation? Honeybees (*Apis mellifera*) in Saharan oases. *Conservation Genetics,* 11, 2085-2089.

SHAIBI, T., MUÑOZ, I., DALL'OLIO, R., LODESANI, M., DE LA RÚA, P. & MORITZ, R. F. A. 2009. *Apis mellifera* evolutionary lineages in Northern Africa: Libya, where orient meets occident. *Insectes Sociaux,* 56, 293-300.

SHEPPARD, W. S., ARIAS, M. C., GRECH, A. & MEIXNER, M. D. 1997. *Apis mellifera ruttneri*, a new honey bee subspecies from Malta. *Apidologie*, 28, 287-293.

SHEPPARD, W. S. & MEIXNER, M. D. 2003. *Apis mellifera pomonella*, a new honey bee subspecies from Central Asia. *Apidologie*, 34, 367-375.

SHEPPARD, W. S., SOARES, A. E. E., DEJONG, D. & SHIMANUKI, H. 1991. Hybrid status of honey bee populations near the historic origin of Africanization in Brazil. *Apidologie*, 22, 643-652.

SILBERRAD, R. E. M. 1970. *Bee-keeping in Seychelles*, Union Vale, Mahé, Government Printer.

SIMBERLOFF, D. S. 1974. Equilibrium theory of island biogeography and ecology. *Annual review of Ecology and Systematics*, 161-182.

SMITH, D. R., TAYLOR, O. R. & BROWN, W. M. 1989. Neotropical Africanized honey bees have African mitochondrial DNA. *Nature*, 339, 213-5.

SOLIGNAC, M., VAUTRIN, D., LOISEAU, A., MOUGEL, F., BAUDRY, E., ESTOUP, A., GARNERY, L., HABERL, M. & CORNUET, J.-M. 2003. Five hundred and fifty microsatellite markers for the study of the honeybee (*Apis mellifera* L.) genome. *Molecular Ecology Notes*, 3, 307-311.

SOLORZANO, C. D., SZALANSKI, A. L., KENCE, M., MCKERN, J. A., AUSTIN, J. W. & KENCE, A. 2009. Phylogeography and population genetics of honey bees (*Apis mellifera*) From Turkey based on COI-COII sequence data. *Sociobiology*, 53, 237-246.

SOUSA, V. & HEY, J. 2013. Understanding the origin of species with genome-scale data: modelling gene flow. *Nature Reviews Genetics*, 14, 404-414.

STOREY, M., MAHONEY, J. J., SAUNDERS, A. D., DUNCAN, R. A., KELLEY, S. P. & COFFIN, M. F. 1995. Timing of hot spot—related volcanism and the breakup of Madagascar and India. *Science*, 267, 852-855.

STRASBERG, D., ROUGET, M., RICHARDSON, D. M., BARET, S., DUPONT, J. & COWLING, R. M. 2005. An Assessment of Habitat Diversity and Transformation on La Réunion Island (Mascarene Islands, Indian Ocean) as a Basis for Identifying Broad-scale Conservation Priorities. *Biodiversity and Conservation*, 14, 3015-3032.

STRIJK, J. S., NOYES, R. D., STRASBERG, D., CRUAUD, C., GAVORY, F., CHASE, M. W., ABBOTT, R. J. & THÉBAUD, C. 2012. In and out of Madagascar: dispersal to peripheral islands, insular speciation and diversification of Indian Ocean daisy trees (Psiadia, Asteraceae). *PloS one*, 7, e42932.

SUAREZ, A. V. & TSUTSUI, N. D. 2008. The evolutionary consequences of biological invasions. *Molecular Ecology*, 17, 351-360.

SWABEY, C. 1970. The endemic flora of the Seychelle islands and its conservation. *Biological Conservation,* 2, 171-177.

SZALANSKI, A. L. & MAGNUS, R. M. 2010. Mitochondrial DNA characterization of Africanized honey bee (*Apis mellifera* L.) populations from the USA. *Journal of Apicultural Research and Bee World,* 49, 177-185.

TAMURA, K., PETERSON, D., PETERSON, N., STECHER, G., NEI, M. & KUMAR, S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution,* 28, 2731-2739.

TARPY, D. R., VANENGELSDORP, D. & PETTIS, J. S. 2013. Genetic diversity affects colony survivorship in commercial honey bee colonies. *Naturwissenschaften,* 100, 723-728.

TEALDI, C. 1990. The Seychelle islands, a paradise also for bees and beekeeping. *Ape Nostra Amica,* 12, 40-42.

TEAM, R. D. C. 2005. R: A language and environment for statistical computing. ISBN 3-900051-07-0. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria, 2013. url: http://www. R-project. org.

TEBBICH, S., STERELNY, K. & TESCHKE, I. 2010. The tale of the finch: adaptive radiation and behavioural flexibility. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences,* 365, 1099-1109.

TECHER, M. A., CLÉMENCET, J., SIMIAND, C., PORTLOUIS, G., REYNAUD, B. & DELATTE, H. 2015a. Genetic diversity of the honeybee (Apis mellifera L.) populations in the Seychelles archipelago. *Insect Conservation and Diversity,* n/a-n/a.

TECHER, M. A., CLÉMENCET, J., TURPIN, P., VOLBERT, N., REYNAUD, B. & DELATTE, H. 2015b. Genetic characterization of the honeybee (*Apis mellifera*) population of Rodrigues Island, based on microsatellite and mitochondrial DNA. *Apidologie,* 46, 445-454.

THÉBAUD, C., WARREN, B. H., STRASBERG, D. & CHEKE, A. 2009. Mascarene islands, biology. *Atoll Research Bulletin,* 127, 1-216.

TORSVIK, T. H., AMUNDSEN, H., HARTZ, E. H., CORFU, F., KUSZNIR, N., GAINA, C., DOUBROVINE, P. V., STEINBERGER, B., ASHWAL, L. D. & JAMTVEIT, B. 2013. A Precambrian microcontinent in the Indian Ocean. *Nature Geosciences,* 6, 223-227.

TOULLEC, A. N. K. 2008. *Abeille noire, Apis mellifera mellifera, Historique et Sauvegarde.* Ph.D, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort.

TRIANTIS, K. A., ECONOMO, E. P., GUILHAUMON, F. & RICKLEFS, R. E. 2015. Diversity regulation at macro-scales: species richness on oceanic archipelagos. *Global Ecology and Biogeography*, 24, 594-605.

TRIOLO, J. 2005. Guide pour la restauration écologique de la végétation indigène. 91.

VAN OOSTERHOUT, C., HUTCHINSON, W. F., WILLS, D. P. M. & SHIPLEY, P. 2004a. Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4, 535-538.

VAN OOSTERHOUT, C., HUTCHINSON, W. F., WILLS, D. P. M. & SHIPLEY, P. 2004b. Microchecker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4, 535-538.

VANENGELSDORP, D., HAYES, J., JR., UNDERWOOD, R. M. & PETTIS, J. 2008. A Survey of Honey Bee Colony Losses in the U.S., Fall 2007 to Spring 2008. *PLoS ONE*, 3, e4071.

VANENGELSDORP, D. & MEIXNER, M. D. 2010. A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103, S80-S95.

VASCONCELOS, R., CARRANZA, S. & JAMES HARRIS, D. 2010. Insight into an island radiation: the Tarentola geckos of the Cape Verde archipelago. *Journal of Biogeography*, 37, 1047-1060.

VISSCHER, P. K. & SEELEY, T. D. 1982. Foraging strategy of honeybee colonies in a temperate deciduous forest. *Ecology*, 1790-1801.

WALLACE, A. R. 1869. *The Malay Archipelago: the land of the orang-utan and the bird of paradise; a narrative of travel, with studies of man and nature*, Courier Corporation.

WALLBERG, A., HAN, F., WELLHAGEN, G., DAHLE, B., KAWATA, M., HADDAD, N., SIMÕES, Z. L. P., ALLSOPP, M. H., KANDEMIR, I., DE LA RÚA, P., PIRK, C. W. & WEBSTER, M. T. 2014. A worldwide survey of genome sequence variation provides insight into the evolutionary history of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature Genetics*, 8 p.

WANG, Z., LIU, Z., WU, X., YAN, W. & ZENG, Z. 2012. Polymorphism analysis of csd gene in six *Apis mellifera* subspecies. *Molecular Biology Reports*, 39, 3067-71.

WARREN, B. H., BERMINGHAM, E., BOURGEOIS, Y., ESTEP, L. K., PRYS-JONES, R. P., STRASBERG, D. & THÉBAUD, C. 2012. Hybridization and barriers to gene flow in an island bird radiation. *Evolution*, 66, 1490-1505.

WARREN, B. H., BERMINGHAM, E., BOWIE, R. C. K., PRYS-JONES, R. P. & THÉBAUD, C. 2003. Molecular phylogeography reveals island colonization history and

diversification of western Indian Ocean sunbirds (< i> Nectarinia</i>: Nectariniidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution,* 29, 67-85.

WARREN, B. H., BERMINGHAM, E., PRYS-JONES, R. P. & THEBAUD, C. 2006. Immigration, species radiation and extinction in a highly diverse songbird lineage: white-eyes on Indian Ocean islands. *Molecular Ecology,* 15, 3769-3786.

WARREN, B. H., SIMBERLOFF, D., RICKLEFS, R. E., AGUILÉE, R., CONDAMINE, F. L., GRAVEL, D., MORLON, H., MOUQUET, N., ROSINDELL, J. & CASQUET, J. 2015. Islands as model systems in ecology and evolution: prospects fifty years after MacArthur-Wilson. *Ecology Letters,* 18, 200-217.

WARREN, B. H., STRASBERG, D., BRUGGEMANN, J. H., PRYS-JONES, R. P. & THÉBAUD, C. 2010. Why does the biota of the Madagascar region have such a strong Asiatic flavour? *Cladistics,* 26, 526-538.

WEIR, B. S. & COCKERHAM, C. C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution,* 1358-1370.

WEYENETH, N., GOODMAN, S. M., STANLEY, W. T. & RUEDI, M. 2008. The biogeography of Miniopterus bats (Chiroptera: Miniopteridae) from the Comoro Archipelago inferred from mitochondrial DNA. *Molecular Ecology,* 17, 5205-5219.

WHITFIELD, C. W., BEHURA, S. K., BERLOCHER, S. H., CLARK, A. G., JOHNSTON, J. S., SHEPPARD, W. S., SMITH, D. R., SUAREZ, A. V., WEAVER, D. & TSUTSUI, N. D. 2006. Thrice out of Africa: ancient and recent expansions of the honey bee, *Apis mellifera*. *Science,* 314, 642-645.

WHITTAKER, R. J. 1998. *Island biogeography: ecology, evolution and conservation,* USA, Oxford University Press.

WIKELSKI, M. & WREGE, P. H. 2000. Niche expansion, body size, and survival in Galápagos marine iguanas. *Oecologia,* 124, 107-115.

WILSON, E. O. 1971. *The insect societies,* Harvard, Belknap Press.

WINSTON, M. L. 1991. *The biology of the honey bee,* Harvard Univ Pr.

WINSTON, M. L. 1992. *Killer bees. the africanized honey bee in the americas,* Harvard University Press.

WINSTON, M. L. 1994. The Africanized 'killer' bee: biology and public health. *Quarterly Journal of Medicine,* 87, 263-7.

ZAVALETA, E. S., HOBBS, R. J. & MOONEY, H. A. 2001. Viewing invasive species removal in a whole-ecosystem context. *Trends in Ecology & Evolution,* 16, 454-459.

ZAYED, A. & WHITFIELD, C. W. 2008. A genome-wide signature of positive selection in ancient and recent invasive expansions of the honey bee *Apis mellifera*.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **105, 3421-3426.**

ZEH, J. A. & ZEH, D. W. 2001. Reproductive mode and the genetic benefits of polyandry. *Animal Behaviour,* **61, 1051-1063.**

Annexe 1 : Curriculum Vitae

TECHER Maéva
Née le 24/11/1989
Nationalité Française
Langue française et anglais
Permis B
maeva.techer@hotmail.fr
maeva-angelique.techer@cirad.fr

FORMATIONS ACADEMIQUES

2012-2015 **Doctorat de Biologie des Populations avec préparation du label Agreenium**
Soutenue le 20 Novembre 2015, Université de La Réunion devant le jury suivant : Lounès Chicki, (Chargé de Recherche, HDR, CNRS, Toulouse), Alain Vignal (Directeur de Recherche, INRA, Toulouse), Lionel Garnery (Maître de conférences, Université Paris-Sud) et Dominique Strasberg (Professeur, Université de La Réunion).

Directeur de thèse : **Bernard Reynaud** (Professeur, Université de La Réunion)
Co-encadrantes : **Johanna CLEMENCET** (Maître de conférences, Université de la Réunion) et **Hélène DELATTE** (Chercheur, HDR, CIRAD, La Réunion)

2010-2012 **Master Sciences du Vivant spécialité Biodiversité et EcoSystèmes Tropicaux (BEST)**
1ere au classement général sur l'ensemble du Master, Mention bien (M1 et M2), Université de La Réunion

2007-2010 **Licence de Biologie des Organismes et des Populations (BOP)**
Rang : 6/21, mention Assez Bien, Université de La Réunion

2007 **Baccalauréat scientifique spécialité SVT, mention Bien et européenne Anglais**
Lycée Georges Brassens, La Réunion

EXPERIENCES

2012 **Stage de Master 2 « Étude de la diversité et structure génétique de l'abeille *Apis mellifera* à La Réunion »**
UMR PVBMT, Hélène Delatte et Johanna Clémencet

2011 **Stage de Master 1 « Détermination des niveaux de polyandrie chez les colonies d'abeilles à La Réunion »**
UMR PVBMT, Johanna Clémencet et Hélène Delatte

2010 **Stage de 4 mois « Mesures de caractères floraux chez des espèces endémiques de *Dombeya* de La Réunion »**
Institut de Recherche en Mathématiques et Informatique Appliquées (IREMIA), Université de La Réunion, Timothée Le Péchon et Luc Gigord

2009 **Stage d'1 mois « Remise en état de la collection animale de la Faculté des Sciences »**
UMR PVBMT, Johanna Clémencet (M.C.F Université de La Réunion)

2008 **Stage de 2 mois « Initiation à la recherche : extraction d'ADN de Sapotacées et expérimentation en forêt naturelle »**
UMR PVBMT, Laurence Humeau et Sébastien Jaquemet

COMPETENCES

Techniques de laboratoire :

Extraction et amplification d'ADN par PCR, quantification d'ADN par spectrophotométrie, gels d'agarose et MetaPhor (BET ou GelRed®), génotypage, RFLP, SSR, RAPD et séquençage.

Logiciels de génétique des populations :

Adegenet (package R), Arlequin, Bottleneck, Clumpp, Convert, Distruct, DIYABC, DnaSp, FastTree, FigTree, FreeNa, FSTAT, GenAlex, Genepop, Genemapper, Genetix, HPrare, InStruct, Matesoft, Mega, MicroChecker, Network, PeakScanner, Phyloviz, PopArt, Populations, R (bases), Spagedi, Structure, Structure Harvester.

Autres logiciels informatiques :

QGIS, GIMP, Inkscape, Adobe Aura, Photoshop, Microsoft Office Package, Open Office Package, Prezi, EndNote, Zotero, Mendeley.

DISTINCTIONS REÇUES

2009 **Finaliste de l'Eskom Expo for Young Scientists 2009 à l'Université de Pretoria, Afrique du Sud**

1er prix et projet « coup de cœur » des Exposciences Réunion 2009

Lauréate de la 6ème édition du Rosalind Franklin Challenge organisée par le département de biochimie de l'Université de La Réunion sur le sujet « Darwin's theory of evolution : the evolution of a theory »

PUBLICATIONS

1. **Techer, M. A.,** Clémencet, J., Turpin, P., Volbert, N., Reynaud, B. & Delatte, H. 2015. Genetic characterization of the honeybee (*Apis mellifera*) population of Rodrigues Island, based on microsatellite and mitochondrial DNA. Apidologie, 46, 445-454.

2. Rasolofoarivao, H., Clémencet, J., **Techer, M**., Ravaomanarivo, L., Reynaud, B. & Delatte, H. 2015. Genetic diversity of the endemic honeybee: *Apis mellifera unicolor* (Hymenoptera: Apidae) in Madagascar. Apidologie, 1-13.

3. **Techer, M. A.,** Clémencet, J., Simiand, C., Portlouis, G., Reynaud, B. & Delatte, H. 2015. Genetic diversity of the honeybee (Apis mellifera L.) populations in the Seychelles archipelago. Insect Conservation and Diversity, DOI 10.1111/icad.12138

COMMUNICATIONS

CONGRES INTERNATIONAUX :

1. **Techer M. A.**, Clémencet J.*, Simiand C., Turpin P., François T., Speck A., Reynaud B., Delatte H. 2012. Mitochondrial genetic characterization of managed honeybee population from Reunion Island. Eurbee 5, Germany. Poster presented by *

2. **Techer M. A.***, Clémencet J., Simiand, C., Turpin, P., Reynaud, B. & Delatte, H. 2014. Unraveling the mysteries of honeybee in the Mascarene Islands. IUSSI2015, Cairns, Australia, Oral presentation done by *

3. **Techer M. A.***, Clémencet J., Simiand, C., Turpin, P., Reynaud, B. & Delatte, H. 2014. Genetic diversity of *Apis mellifera* populations in the Mascarene archipelago (Indian Ocean). Eurbee 6, Murcia, Spain, Oral presentation done by *

RESTITUTIONS LOCALES :

1. **Techer M. A.** 2013. Présentation du sujet de thèse : Diversité génétique et phylogéographie d'*Apis mellifera ssp*. dans l'océan Indien. Journée des Doctorants UMR PVBMT, 3P, St Pierre, La Réunion.

2. **Techer M. A.** 2013. Étude de la diversité génétique de l'abeille *Apis mellifera* à La Réunion. Réunion apiculteurs et ITSAP, 3P, St Pierre, La Réunion.

3. **Techer M. A.**, Clémencet J., Simiand, C., Turpin, P., Reynaud, B. & Delatte, H. 2014. Diversité et structure génétique de l'abeille *Apis mellifera* dans l'archipel des Mascareignes. Séminaire BioEcotrop, Université de La Réunion, St Denis, La Réunion.

4. **Techer M. A.** 2014. Diversité génétique et phylogéographie de l'abeille domestique *Apis mellifera ssp.* dans la zone océan Indien. Doctoriales 2014, Poster, St Gilles, La Réunion.

5. **Techer M. A.**, Clémencet J., Reynaud, B. & Delatte, H. 2015. Diversité et structure génétique des populations d'abeilles dans le Sud-Ouest de l'océan Indien. Restitutions programme e-PRPV, 3P, St Pierre, La Réunion.

ENCADREMENT

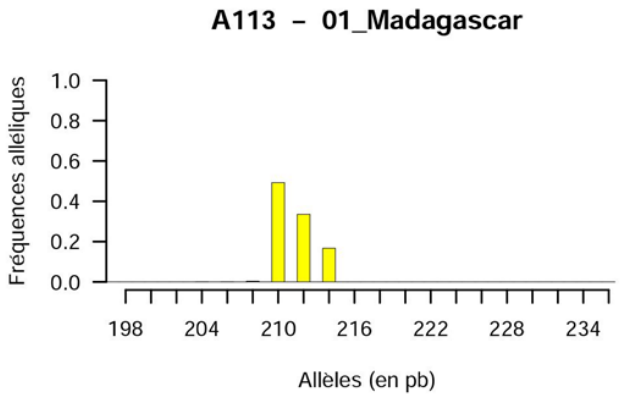
2015 **Julien GALATAUD, Stage de Master 1 BEST, Université de La Réunion.**
Morphométrie de la nervation alaire : Un outil efficace pour identifier les différentes lignées génétiques et sous-espèces d'*Apis mellifera* présentes dans les îles du Sud-Ouest de l'océan Indien ?
Co-encadré avec Johanna Clémencet et Hélène Delatt

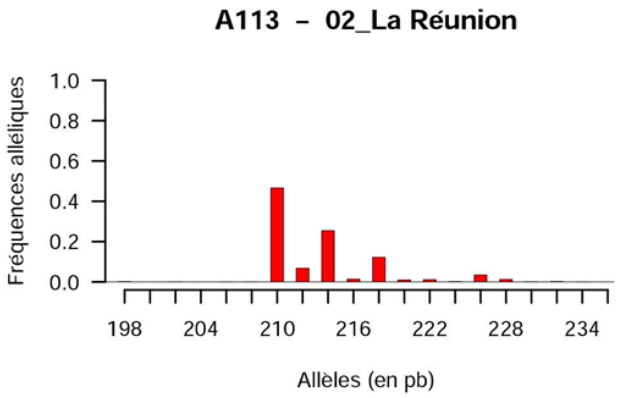
Annexe 2 : Article en co-auteur « Genetic diversity of the endemic honeybee: *Apis mellifera unicolor* (Hymenoptera: Apidae) in Madagascar) »

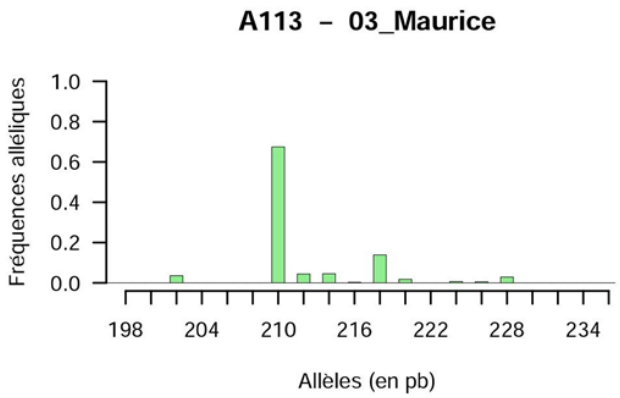
RASOLOFOARIVAO, H., CLÉMENCET, J., TECHER, M., RAVAOMANARIVO, L., REYNAUD, B. & DELATTE, H. 2015. Genetic diversity of the endemic honeybee: Apis mellifera unicolor (Hymenoptera: Apidae) in Madagascar. Apidologie, 1-13., DOI: 10.1007/s13592-015-0362-1

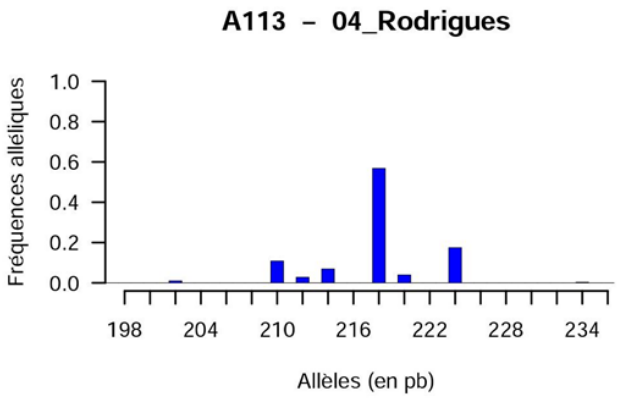
Annexe 3 : Histogrammes de fréquences alléliques des populations du SOOI et de populations continentales d'Afrique et d'Europe pour les 14 microsatellites utilisés

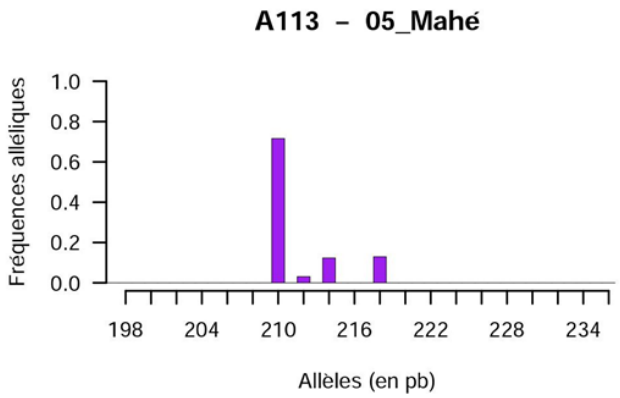
1 : Madagascar, *n* = 865 colonies
2 : La Réunion, *n* = 2050 colonies
3 : Maurice, *n* = 367 colonies
4 : Rodrigues, *n* = 524colonies
5 : Mahé, *n* = 81 colonies
6 : Praslin, *n* = 79 colonies
7 : La Digue, *n* = 49 colonies
8 : Afrique du Sud, *n* = 31 colonies
9 : São Tomé, *n* = 12 colonies
10 : Malawi, *n* = 8 colonies
11 : Zimbabwe, *n* = 14 colonies
12 : République Centrafrique, *n* = 865 colonies
13 : Portugal, *n* = 13 colonies
14 : France, *n* = 48 colonies
15 : Allemagne, *n* = 9 colonies
16 : Italie, *n* = 56 colonies

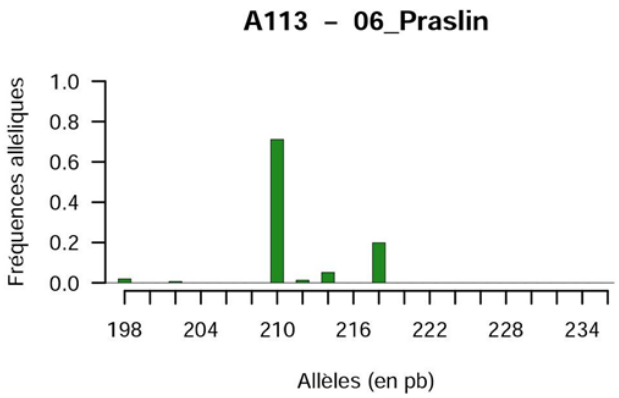

A113 – 01_Madagascar
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
198
204
210
216
222
228
234
Allèles (en pb)

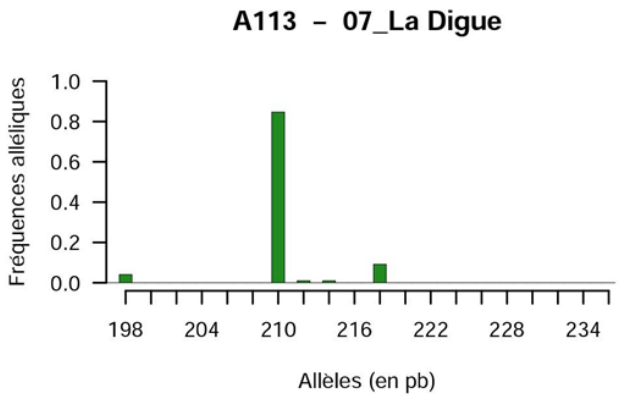

A113 – 02_La Réunion
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
198
204
210
216
222
228
234
Allèles (en pb)

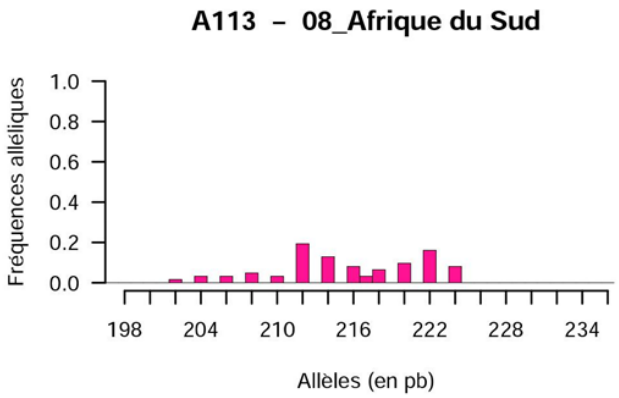

A113 – 03_Maurice
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
198
204
210
216
222
228
234
Allèles (en pb)

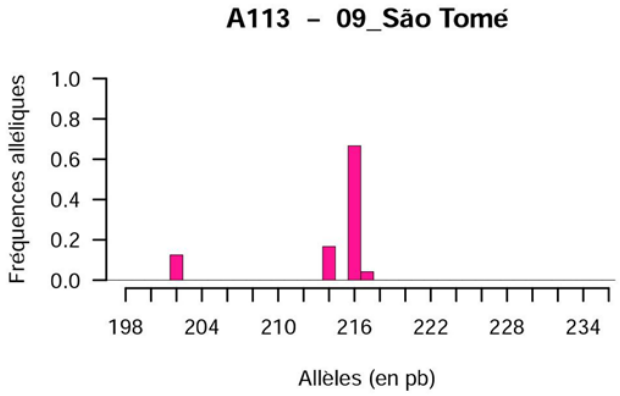

A113 – 04_Rodrigues
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
198
204
210
216
222
228
234
Allèles (en pb)

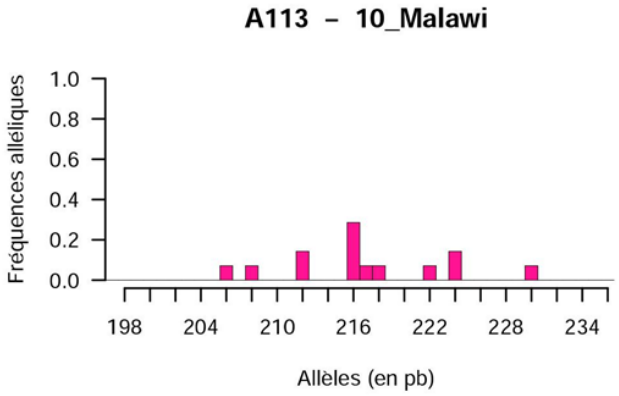

A113 – 05_Mahé
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
198
204
210
216
222
228
234
Allèles (en pb)

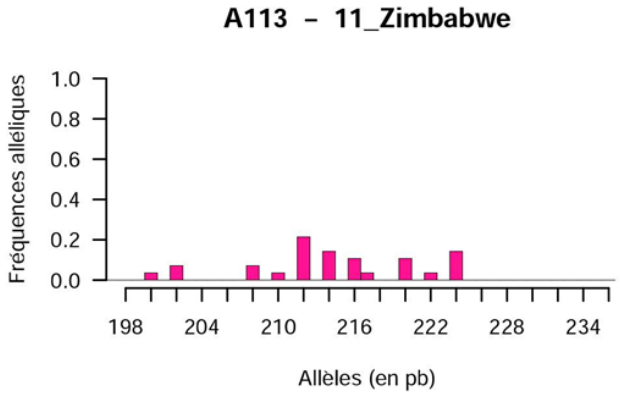

A113 – 06_Praslin
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
198
204
210
216
222
228
234
Allèles (en pb)

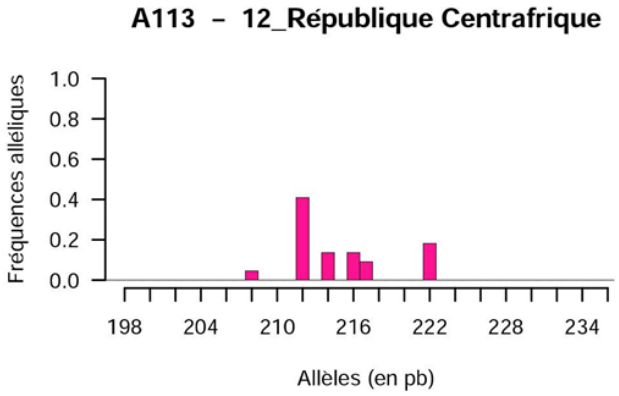

A113 – 07_La Digue
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
198
204
210
216
222
228
234
Allèles (en pb)

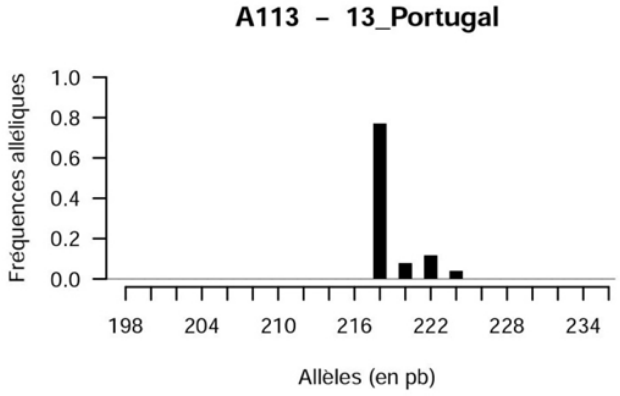

A113 – 08_Afrique du Sud
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
198
204
210
216
222
228
234
Allèles (en pb)

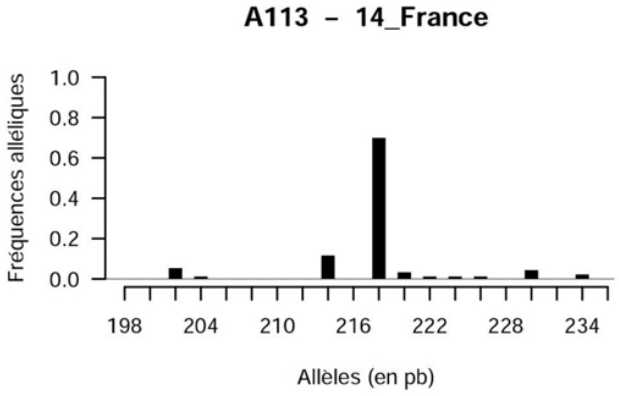

A113 – 09_São Tomé
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
198
204
210
216
222
228
234
Allèles (en pb)

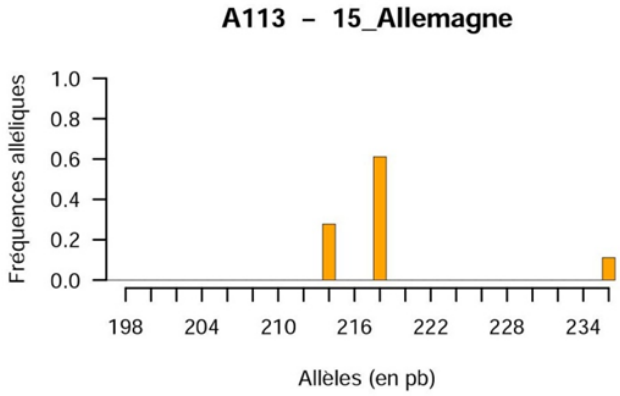

A113 – 10_Malawi
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
198
204
210
216
222
228
234
Allèles (en pb)

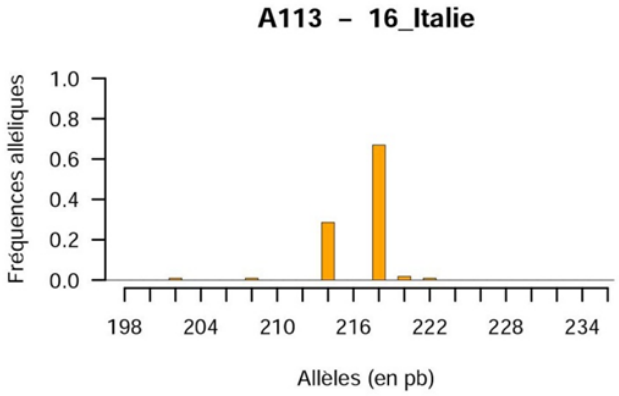

A113 – 11_Zimbabwe
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
198
204
210
216
222
228
234
Allèles (en pb)

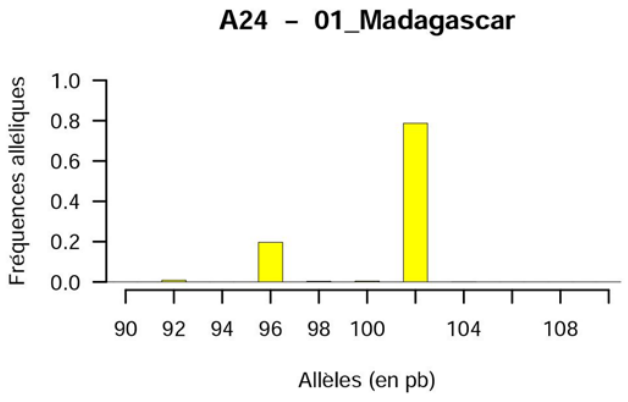

A113 – 12_République Centrafrique
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
198
204
210
216
222
228
234
Allèles (en pb)

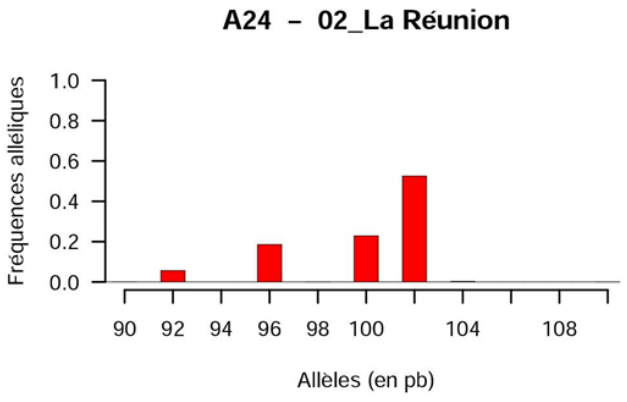

A113 – 13_Portugal
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
198
204
210
216
222
228
234
Allèles (en pb)

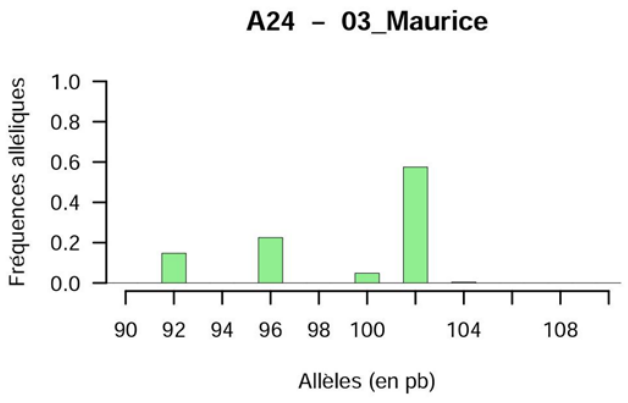

A113 – 14_France
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
198
204
210
216
222
228
234
Allèles (en pb)

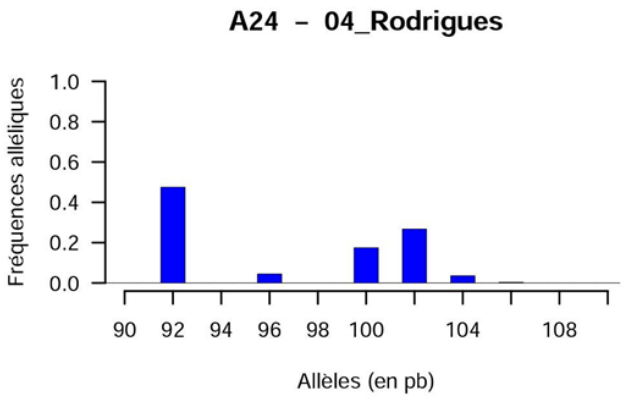

A113 – 15_Allemagne
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
198
204
210
216
222
228
234
Allèles (en pb)

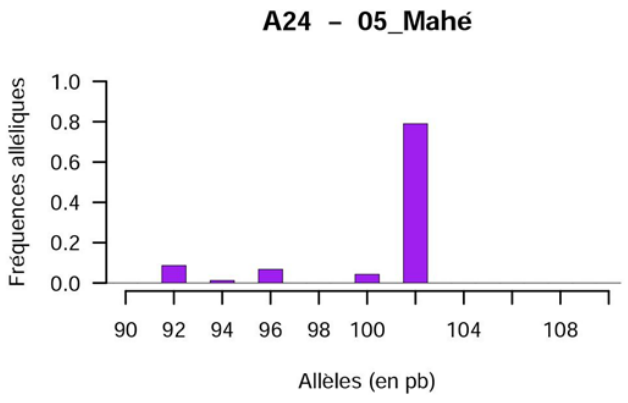

A113 – 16_Italie
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
198
204
210
216
222
228
234
Allèles (en pb)

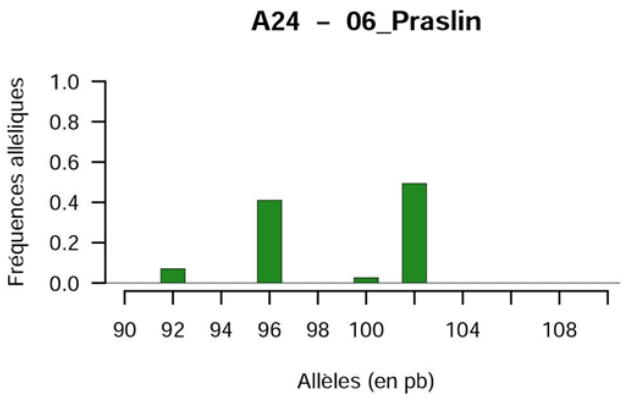

A24 – 01_Madagascar
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
90 92 94 96 98 100 104 108
Allèles (en pb)

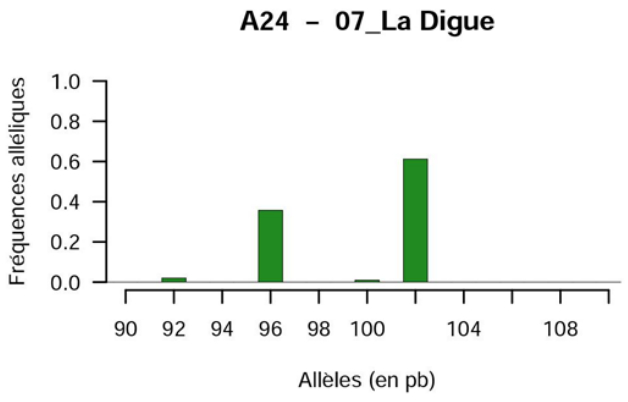

A24 – 02_La Réunion
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
90 92 94 96 98 100 104 108
Allèles (en pb)

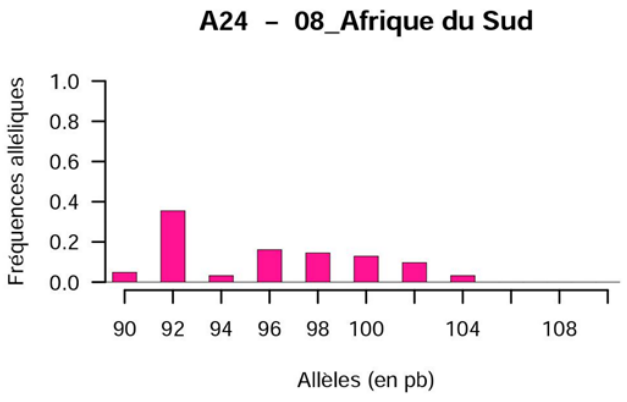

A24 – 03_Maurice
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
90 92 94 96 98 100 104 108
Allèles (en pb)

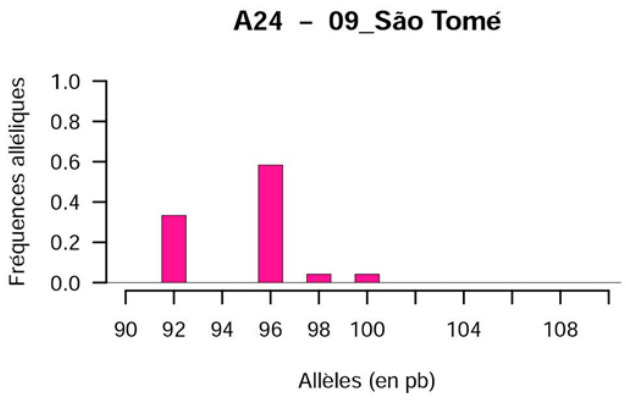

A24 – 04_Rodrigues
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
90 92 94 96 98 100 104 108
Allèles (en pb)

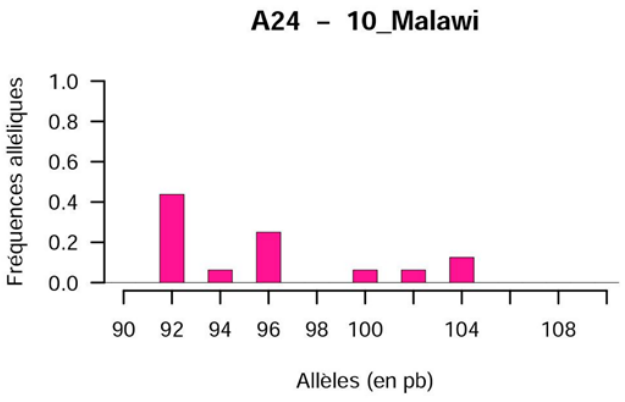

A24 – 05_Mahé
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
90 92 94 96 98 100 104 108
Allèles (en pb)

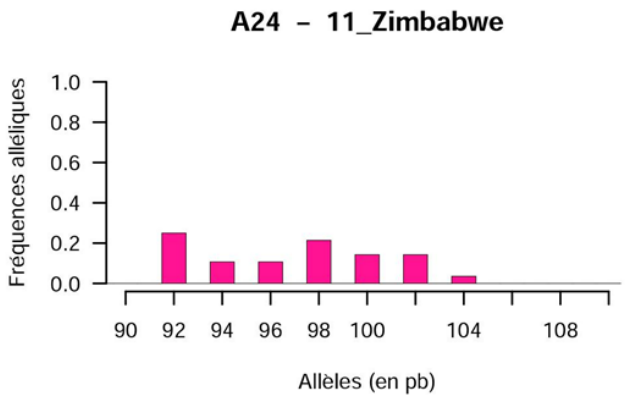

A24 – 06_Praslin
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
90 92 94 96 98 100 104 108
Allèles (en pb)

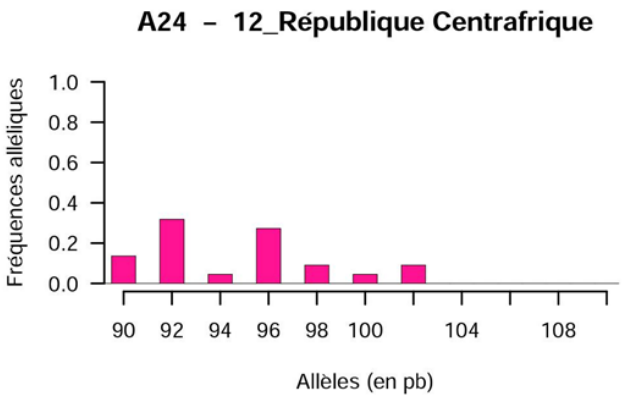

A24 – 07_La Digue
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
90 92 94 96 98 100 104 108
Allèles (en pb)

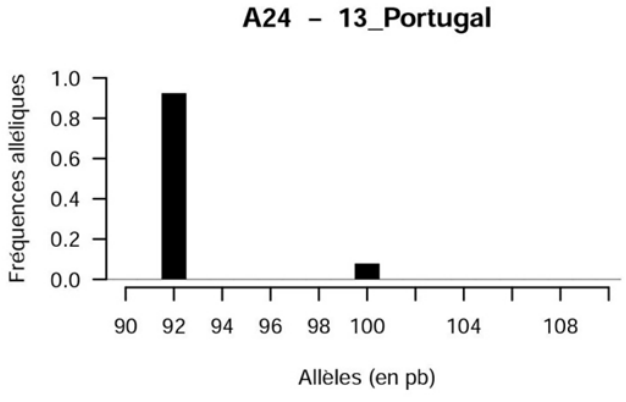

A24 – 08_Afrique du Sud
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
90 92 94 96 98 100 104 108
Allèles (en pb)

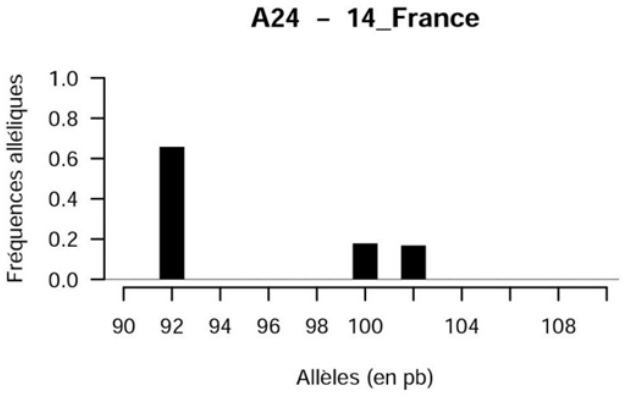

A24 – 09_São Tomé
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
90 92 94 96 98 100 104 108
Allèles (en pb)

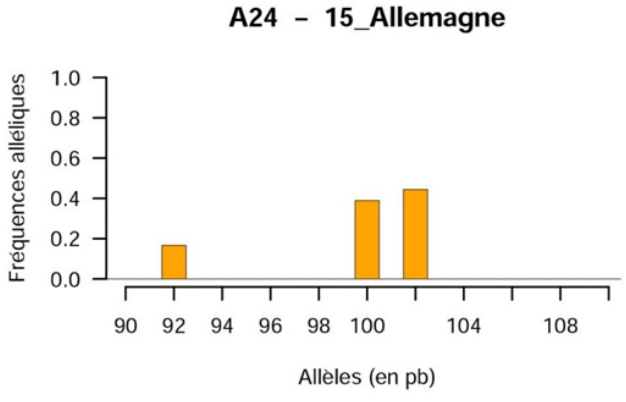

A24 – 10_Malawi
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
90 92 94 96 98 100 104 108
Allèles (en pb)

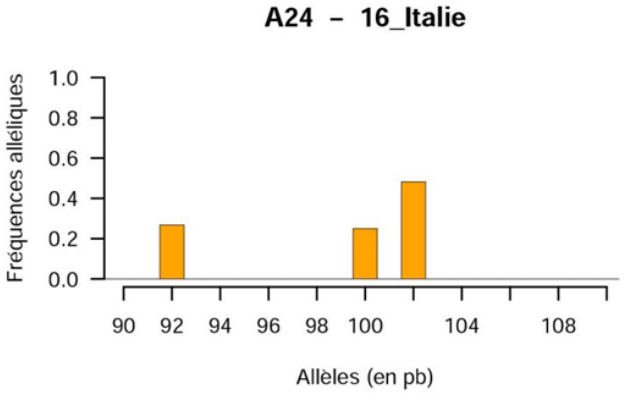

A24 – 11_Zimbabwe
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
90 92 94 96 98 100 104 108
Allèles (en pb)

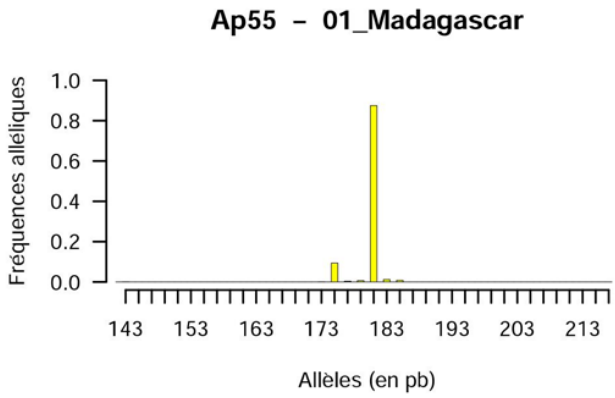

A24 – 12_République Centrafrique
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
90 92 94 96 98 100 104 108
Allèles (en pb)

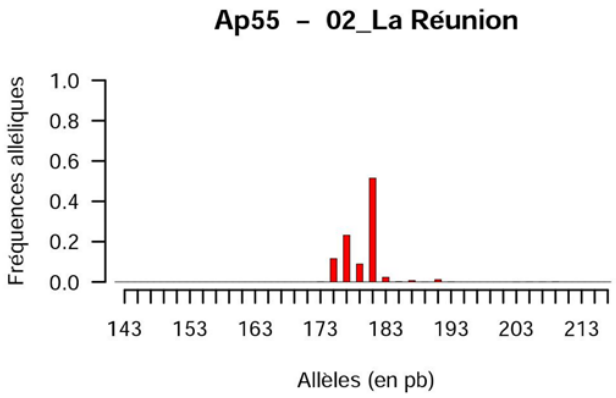

A24 – 13_Portugal
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
90 92 94 96 98 100 104 108
Allèles (en pb)

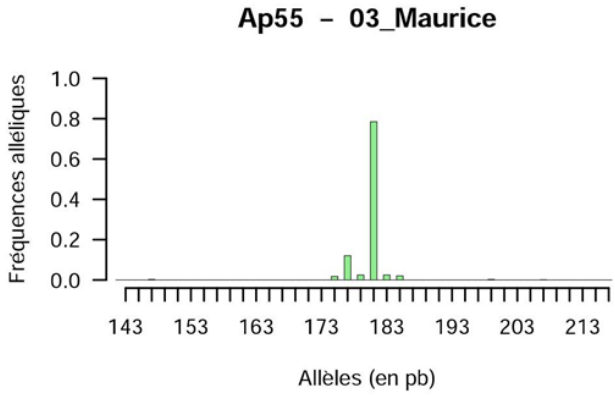

A24 – 14_France
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
90 92 94 96 98 100 104 108
Allèles (en pb)

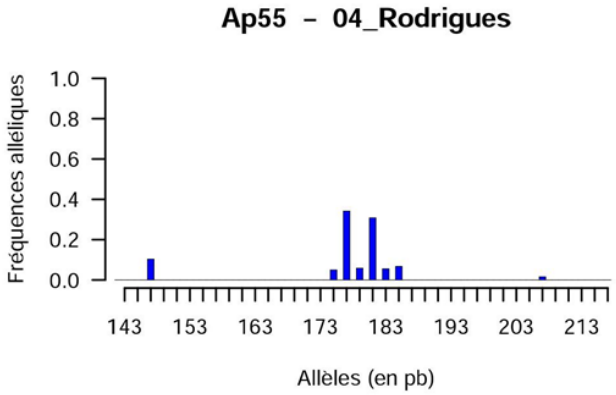

A24 – 15_Allemagne
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
90 92 94 96 98 100 104 108
Allèles (en pb)

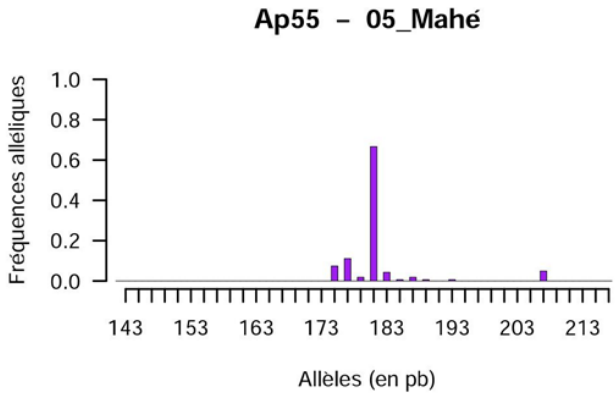

A24 – 16_Italie
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
90 92 94 96 98 100 104 108
Allèles (en pb)

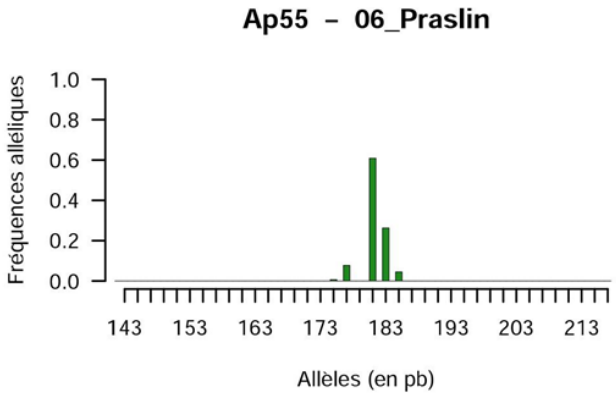

Ap55 – 01_Madagascar
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
143 153 163 173 183 193 203 213
Allèles (en pb)

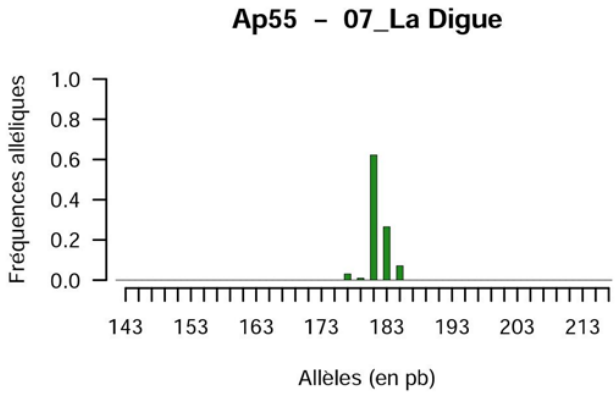

Ap55 – 02_La Réunion
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
143 153 163 173 183 193 203 213
Allèles (en pb)

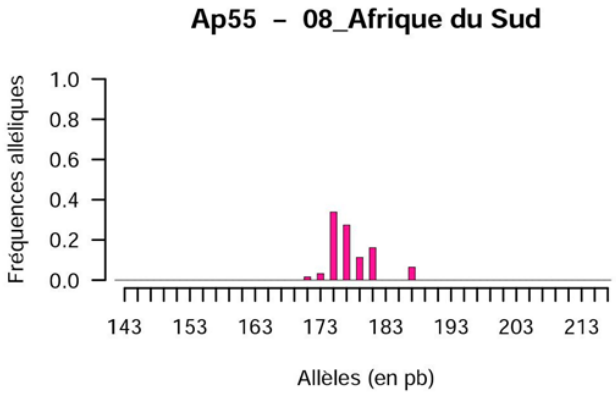

Ap55 – 03_Maurice
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
143 153 163 173 183 193 203 213
Allèles (en pb)

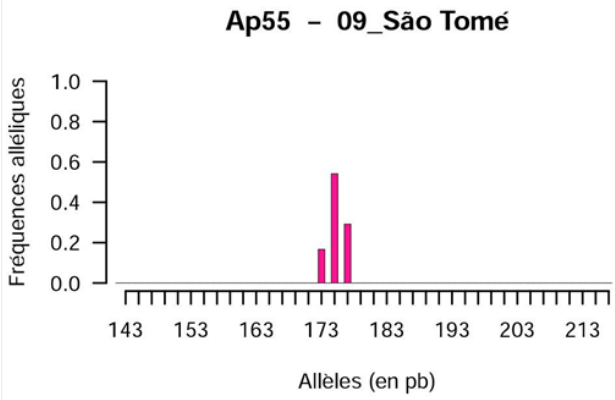

Ap55 – 04_Rodrigues
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
143 153 163 173 183 193 203 213
Allèles (en pb)

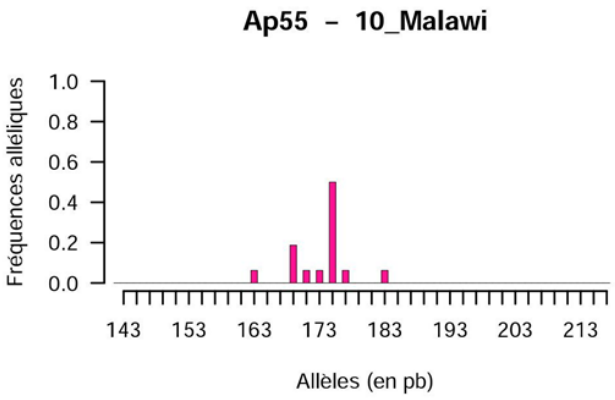

Ap55 – 05_Mahé
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
143 153 163 173 183 193 203 213
Allèles (en pb)

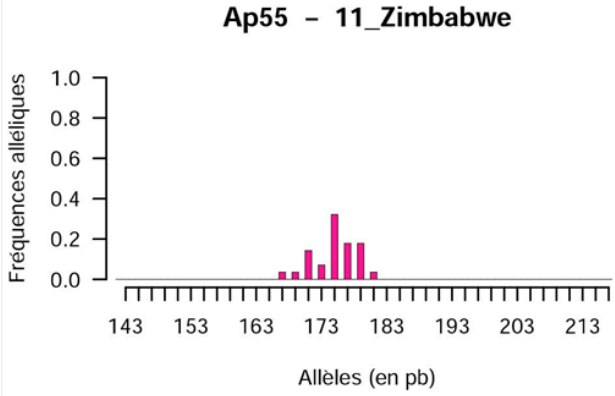

Ap55 – 06_Praslin
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
143 153 163 173 183 193 203 213
Allèles (en pb)

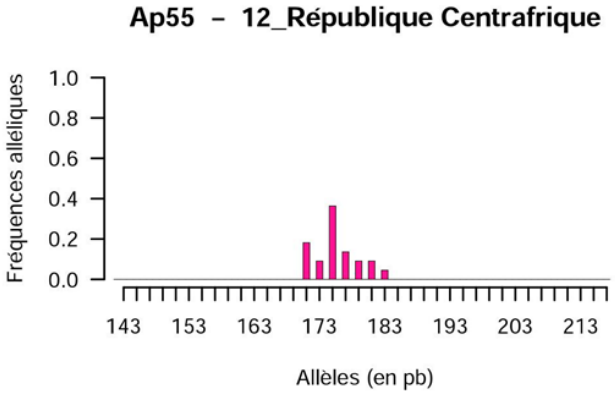

Ap55 – 07_La Digue
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
143 153 163 173 183 193 203 213
Allèles (en pb)

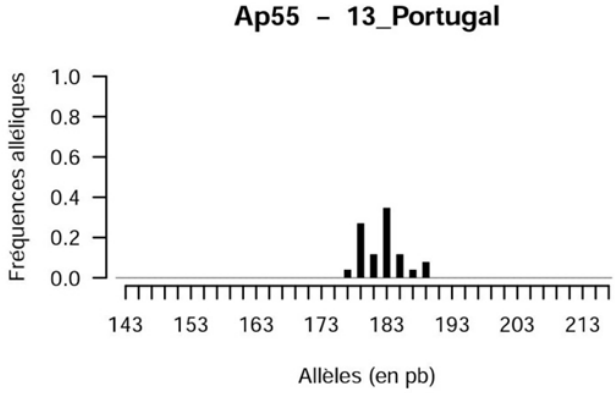

Ap55 – 08_Afrique du Sud
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
143 153 163 173 183 193 203 213
Allèles (en pb)

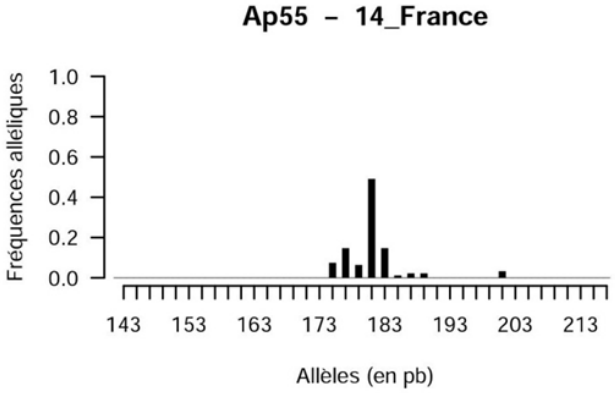

Ap55 – 09_São Tomé
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
143 153 163 173 183 193 203 213
Allèles (en pb)

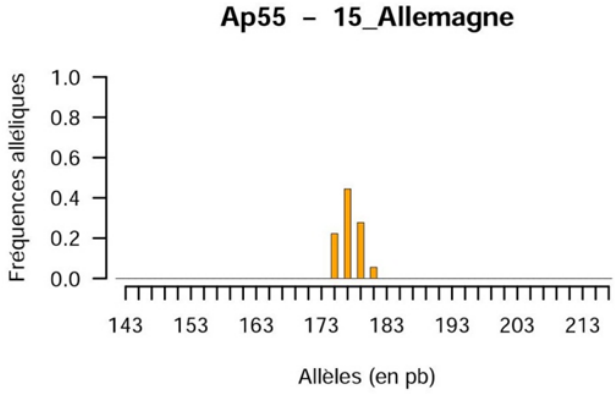

Ap55 – 10_Malawi
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
143 153 163 173 183 193 203 213
Allèles (en pb)

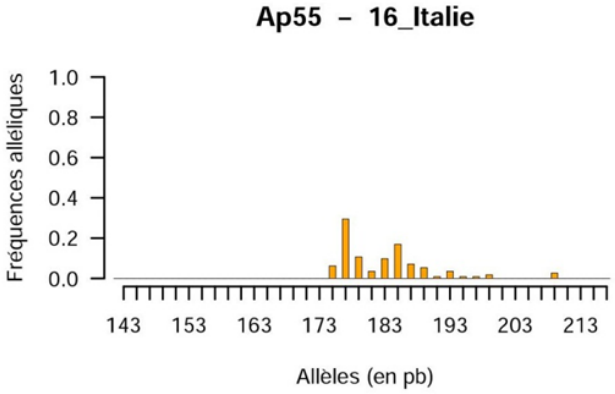

Ap55 – 11_Zimbabwe
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
143 153 163 173 183 193 203 213
Allèles (en pb)

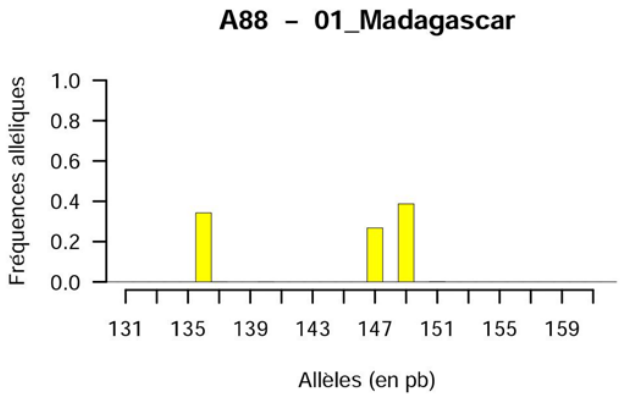

Ap55 – 12_République Centrafrique
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
143 153 163 173 183 193 203 213
Allèles (en pb)

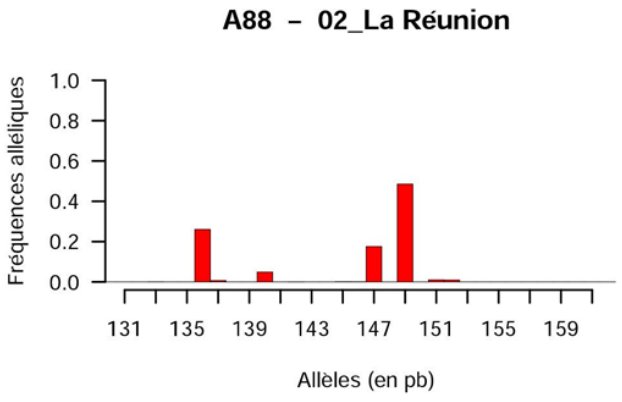

Ap55 – 13_Portugal
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
143 153 163 173 183 193 203 213
Allèles (en pb)

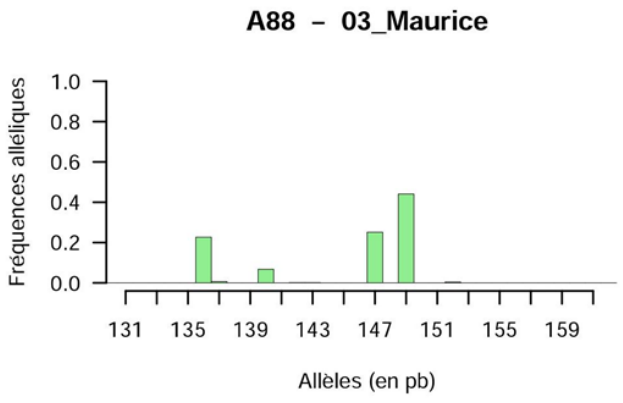

Ap55 – 14_France
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
143 153 163 173 183 193 203 213
Allèles (en pb)

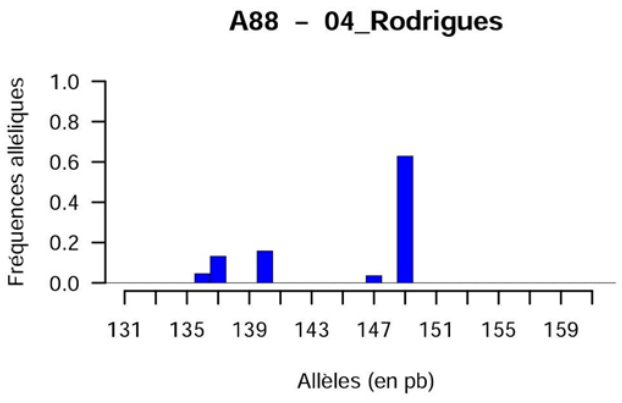

Ap55 – 15_Allemagne
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
143 153 163 173 183 193 203 213
Allèles (en pb)

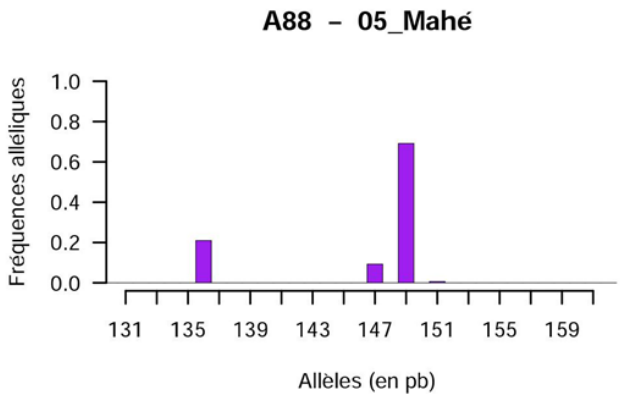

Ap55 – 16_Italie
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
143 153 163 173 183 193 203 213
Allèles (en pb)

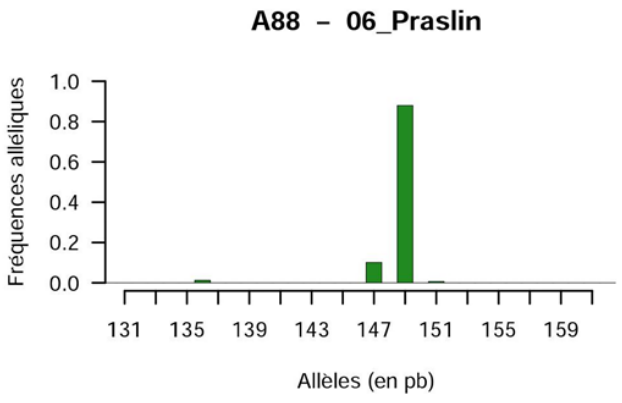

A88 – 01_Madagascar
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
131 135 139 143 147 151 155 159
Allèles (en pb)

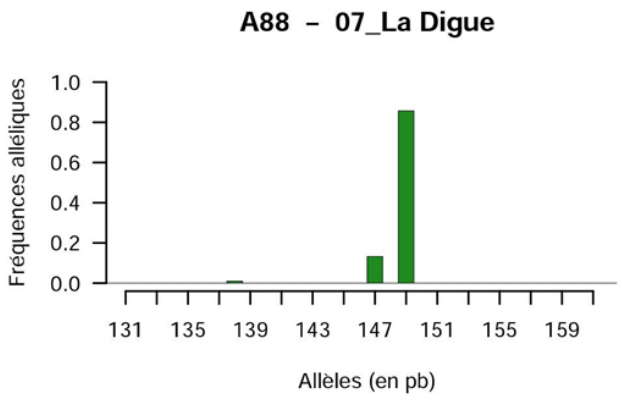

A88 – 02_La Réunion
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
131 135 139 143 147 151 155 159
Allèles (en pb)

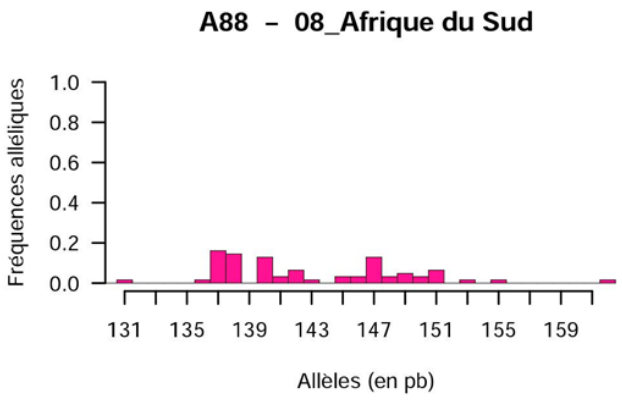

A88 – 03_Maurice
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
131 135 139 143 147 151 155 159
Allèles (en pb)

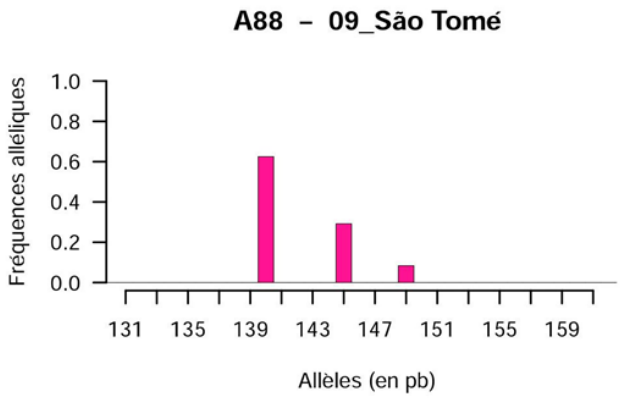

A88 – 04_Rodrigues
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
131 135 139 143 147 151 155 159
Allèles (en pb)

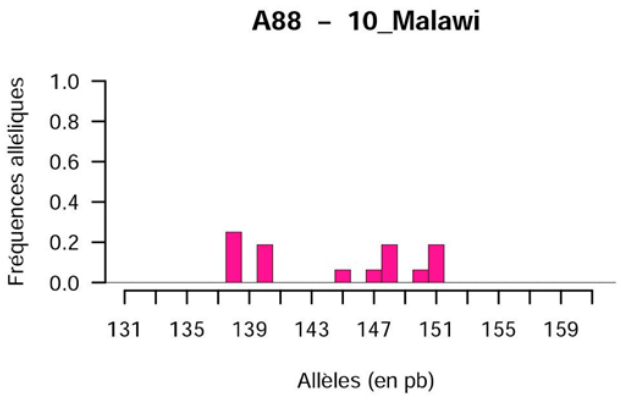

A88 – 05_Mahé
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
131 135 139 143 147 151 155 159
Allèles (en pb)

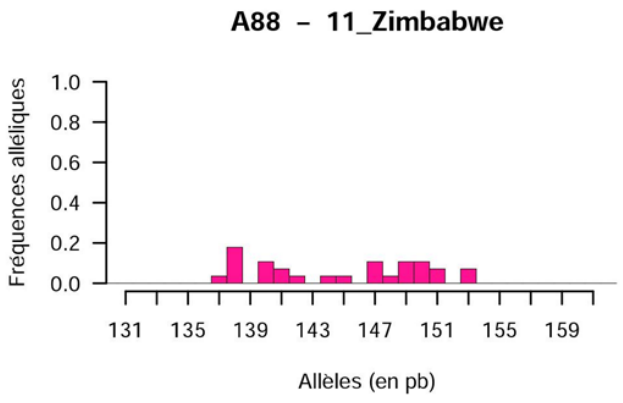

A88 – 06_Praslin
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
131 135 139 143 147 151 155 159
Allèles (en pb)

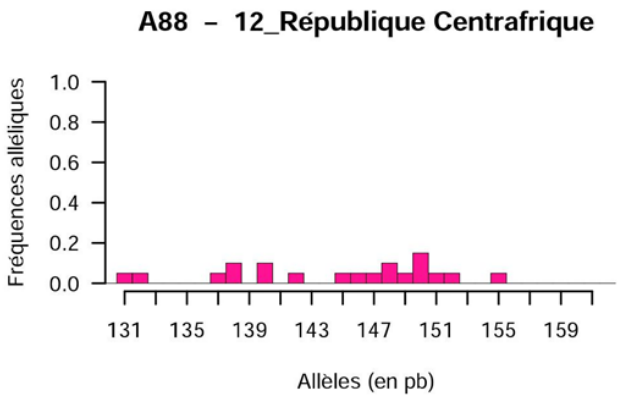

A88 – 07_La Digue
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
131 135 139 143 147 151 155 159
Allèles (en pb)

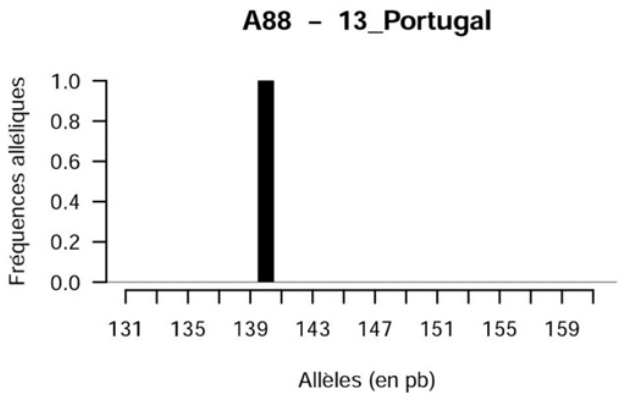

A88 – 08_Afrique du Sud
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
131 135 139 143 147 151 155 159
Allèles (en pb)

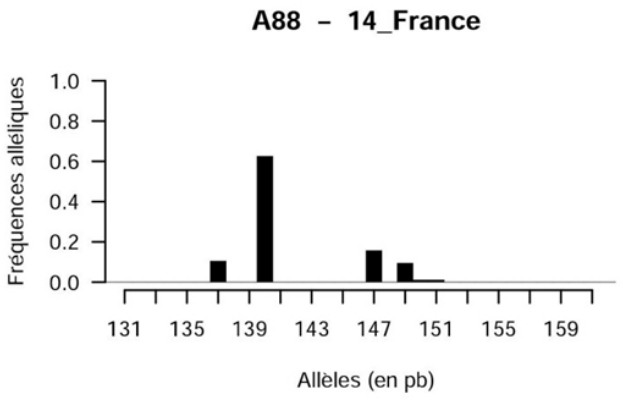

A88 – 09_São Tomé
Fréquences allélliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
131 135 139 143 147 151 155 159
Allèles (en pb)

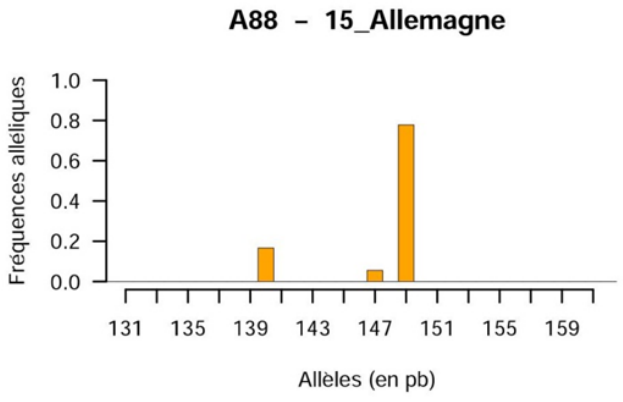

A88 – 10_Malawi
Fréquences allélliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
131 135 139 143 147 151 155 159
Allèles (en pb)

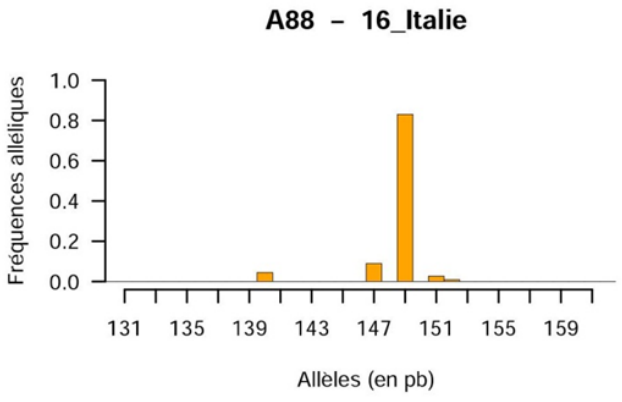

A88 – 11_Zimbabwe
Fréquences allélliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
131 135 139 143 147 151 155 159
Allèles (en pb)

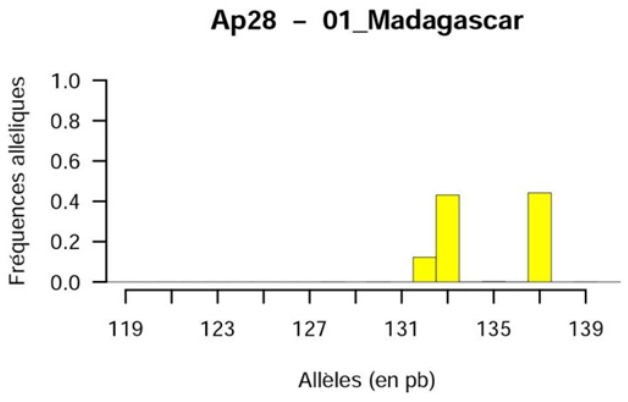

A88 – 12_République Centrafrique
Fréquences allélliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
131 135 139 143 147 151 155 159
Allèles (en pb)

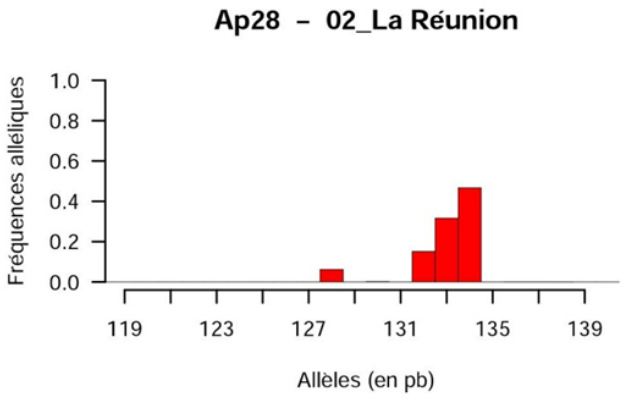

A88 – 13_Portugal
Fréquences allélliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
131 135 139 143 147 151 155 159
Allèles (en pb)

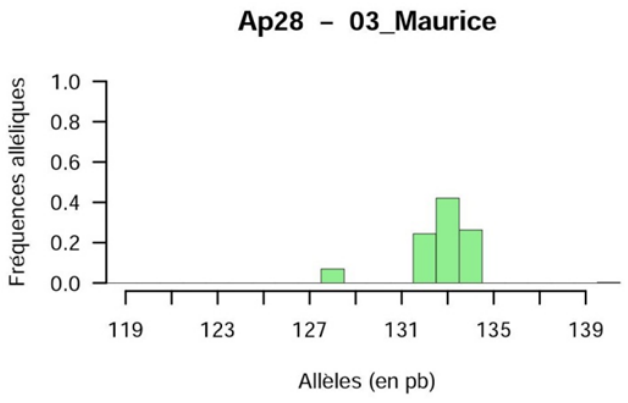

A88 – 14_France
Fréquences allélliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
131 135 139 143 147 151 155 159
Allèles (en pb)

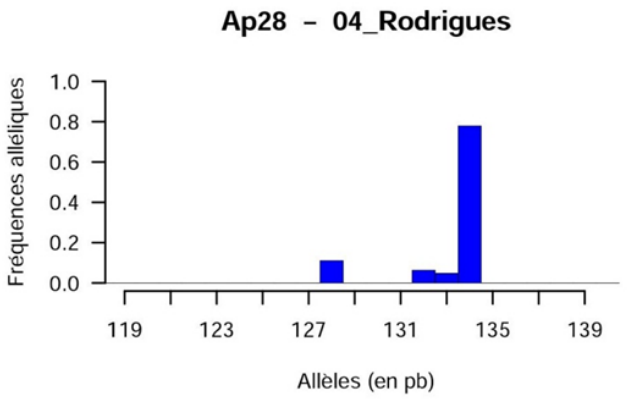

A88 – 15_Allemagne
Fréquences allélliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
131 135 139 143 147 151 155 159
Allèles (en pb)

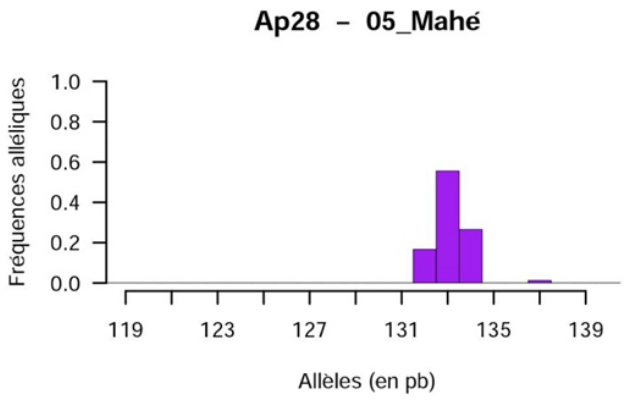

A88 – 16_Italie
Fréquences allélliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
131 135 139 143 147 151 155 159
Allèles (en pb)

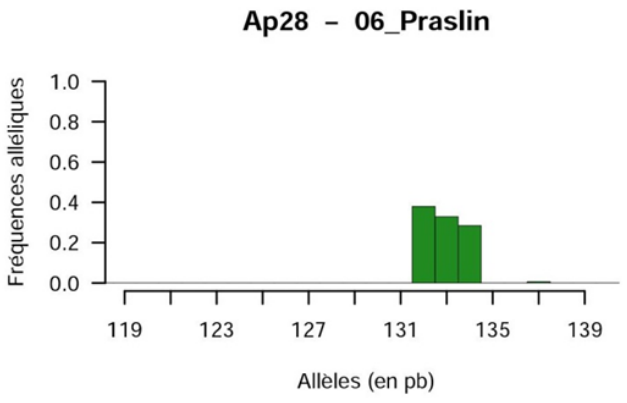

Ap28 – 01_Madagascar
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
119
123
127
131
135
139
Allèles (en pb)

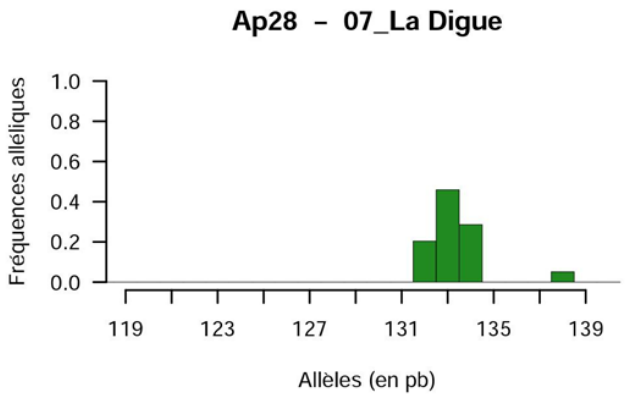

Ap28 – 02_La Réunion
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
119
123
127
131
135
139
Allèles (en pb)

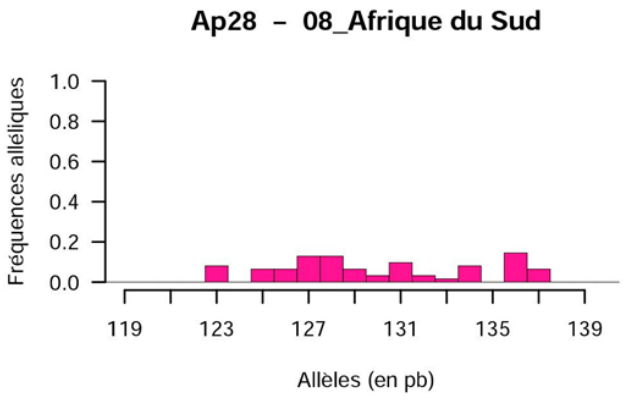

Ap28 – 03_Maurice
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
119
123
127
131
135
139
Allèles (en pb)

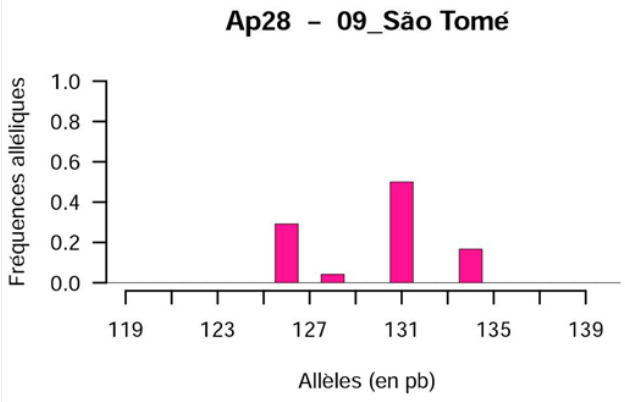

Ap28 – 04_Rodrigues
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
119
123
127
131
135
139
Allèles (en pb)

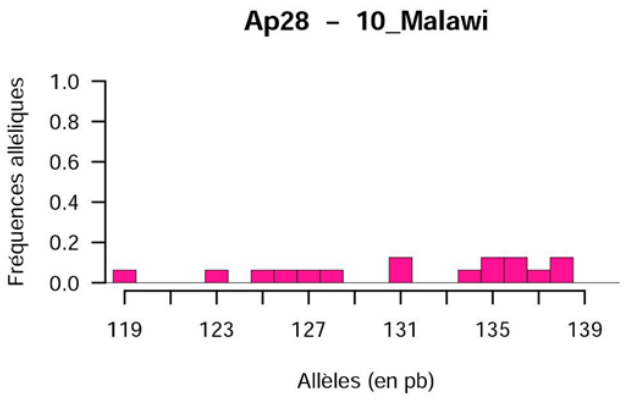

Ap28 – 05_Mahé
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
119
123
127
131
135
139
Allèles (en pb)

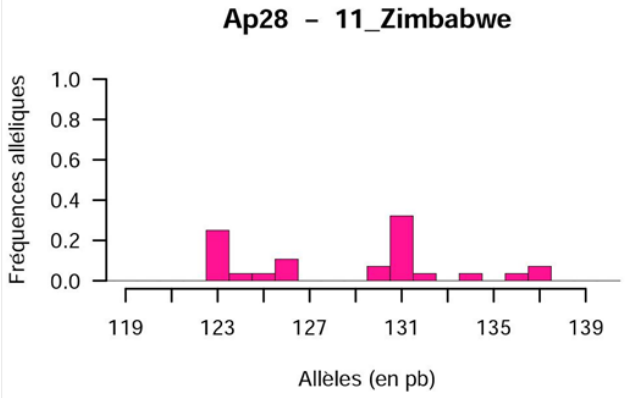

Ap28 – 06_Praslin
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
119
123
127
131
135
139
Allèles (en pb)

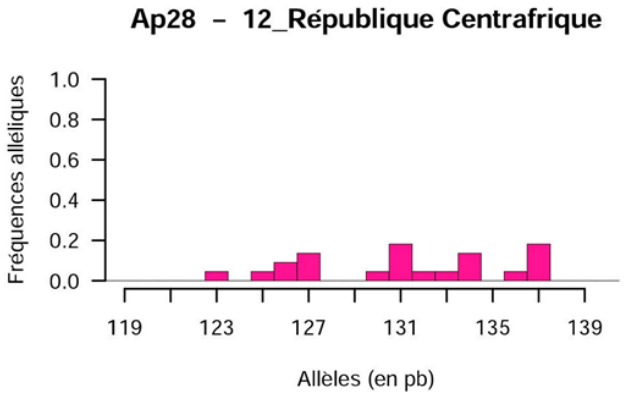

Ap28 – 07_La Digue
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
119
123
127
131
135
139
Allèles (en pb)

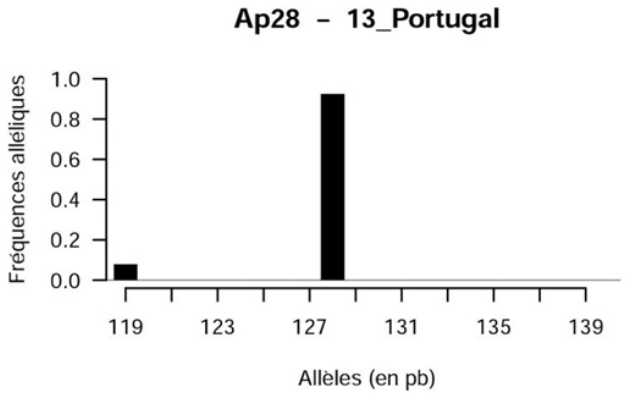

Ap28 – 08_Afrique du Sud
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
119
123
127
131
135
139
Allèles (en pb)

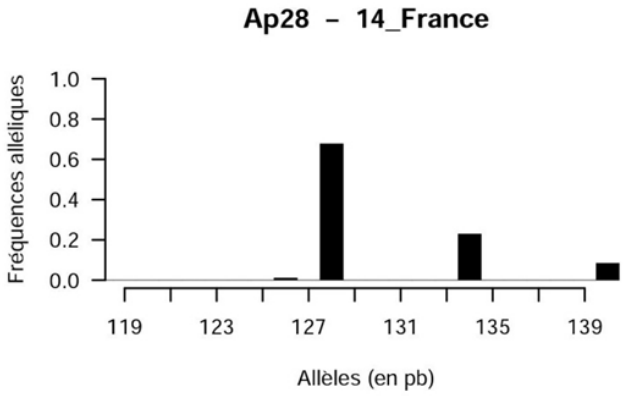

Ap28 – 09_São Tomé
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
119
123
127
131
135
139
Allèles (en pb)

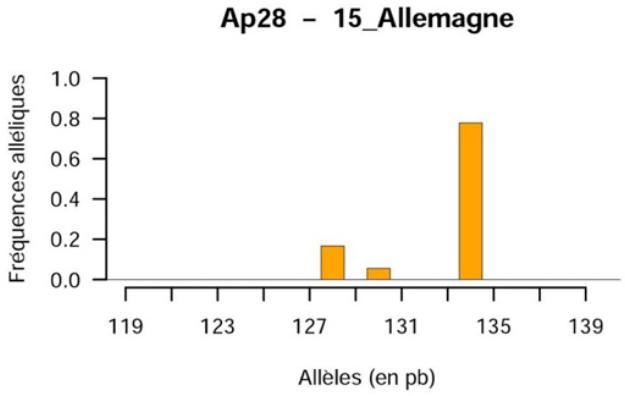

Ap28 – 10_Malawi
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
119
123
127
131
135
139
Allèles (en pb)

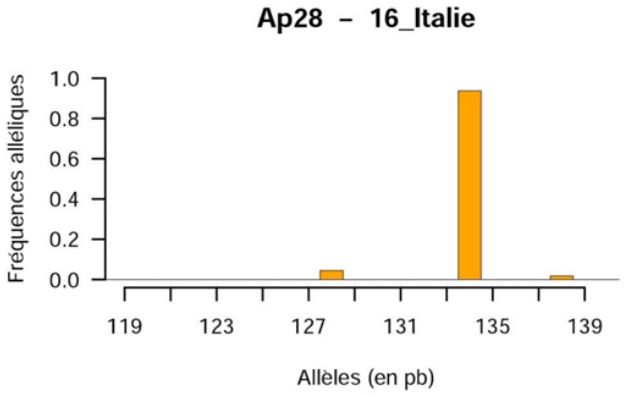

Ap28 – 11_Zimbabwe
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
119
123
127
131
135
139
Allèles (en pb)

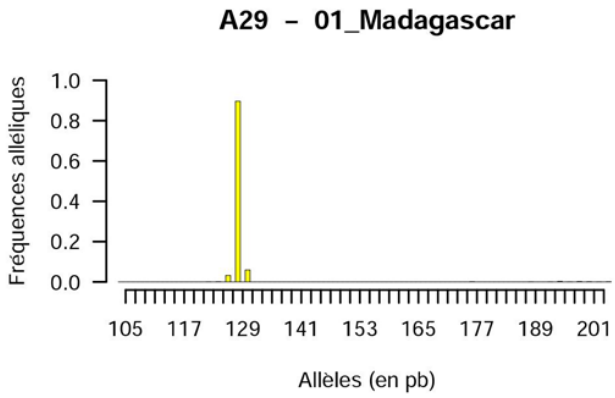

Ap28 – 12_République Centrafrique
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
119
123
127
131
135
139
Allèles (en pb)

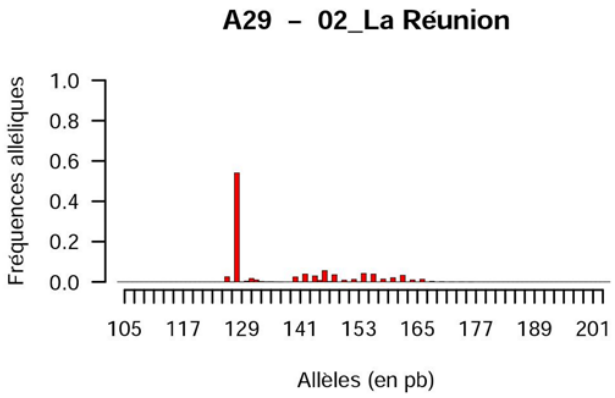

Ap28 – 13_Portugal
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
119
123
127
131
135
139
Allèles (en pb)

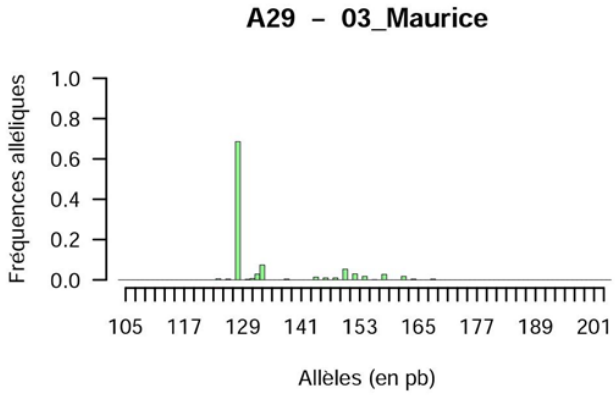

Ap28 – 14_France
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
119
123
127
131
135
139
Allèles (en pb)

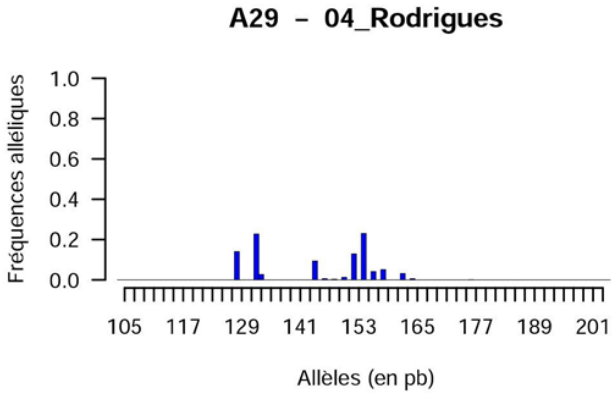

Ap28 – 15_Allemagne
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
119
123
127
131
135
139
Allèles (en pb)

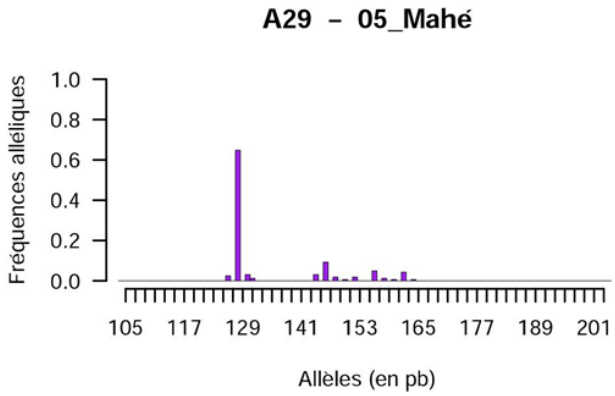

Ap28 – 16_Italie
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
119
123
127
131
135
139
Allèles (en pb)

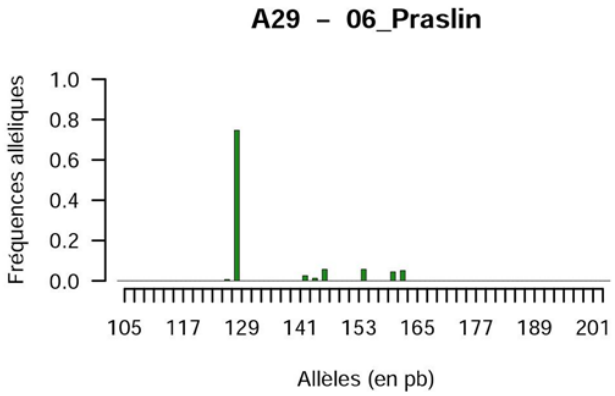

A29 – 01_Madagascar
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
105 117 129 141 153 165 177 189 201
Allèles (en pb)

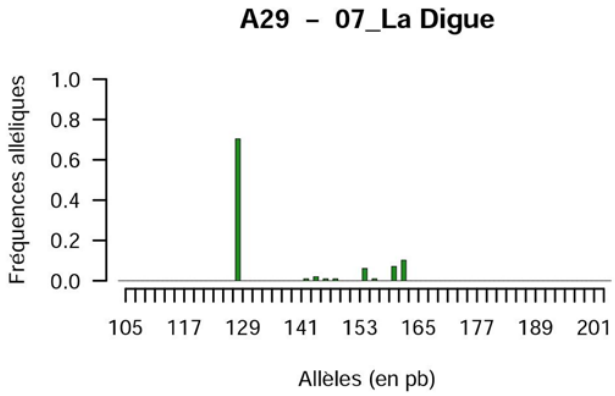

A29 – 02_La Réunion
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
105 117 129 141 153 165 177 189 201
Allèles (en pb)

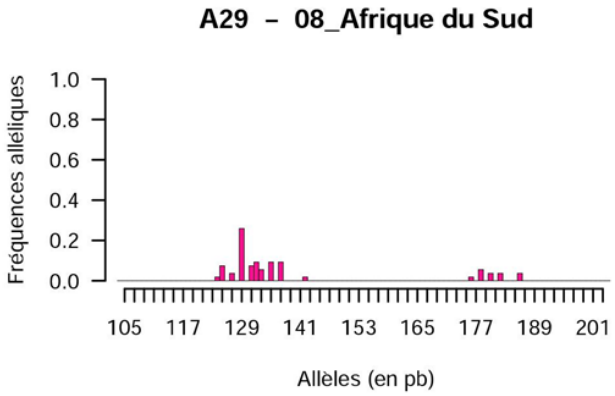

A29 – 03_Maurice
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
105 117 129 141 153 165 177 189 201
Allèles (en pb)

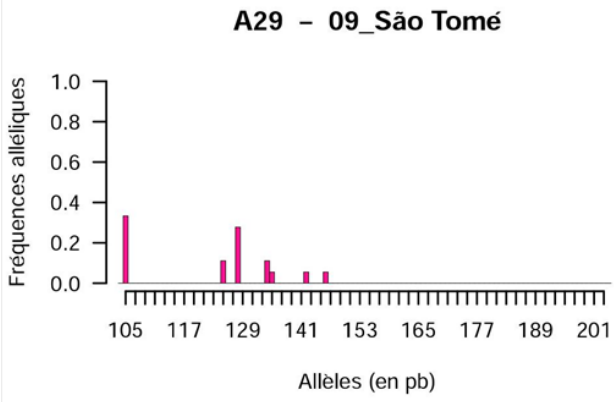

A29 – 04_Rodrigues
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
105 117 129 141 153 165 177 189 201
Allèles (en pb)

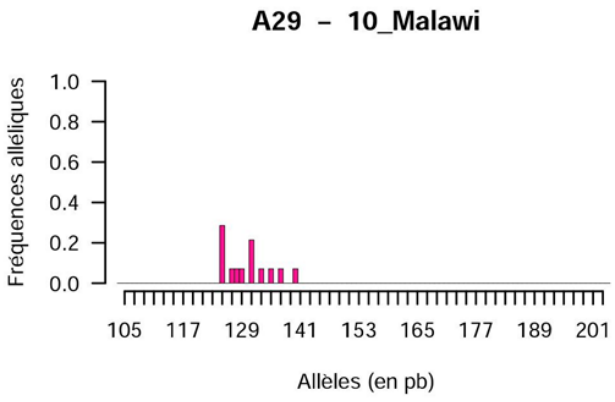

A29 – 05_Mahé
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
105 117 129 141 153 165 177 189 201
Allèles (en pb)

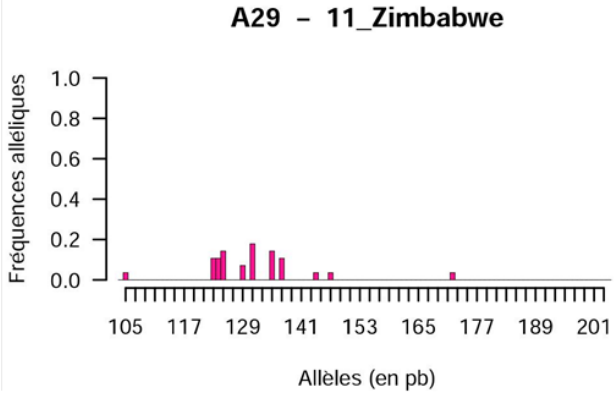

A29 – 06_Praslin
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
105 117 129 141 153 165 177 189 201
Allèles (en pb)

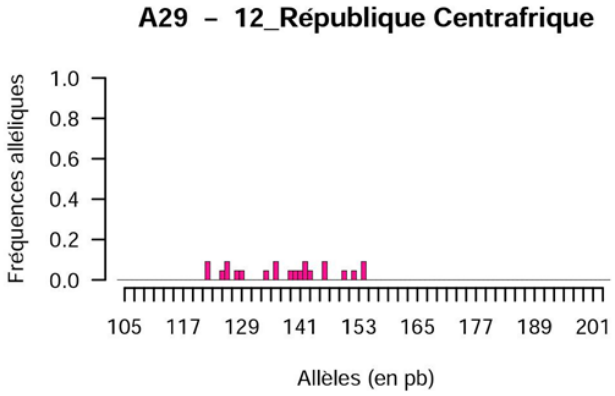

A29 – 07_La Digue
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
105 117 129 141 153 165 177 189 201
Allèles (en pb)

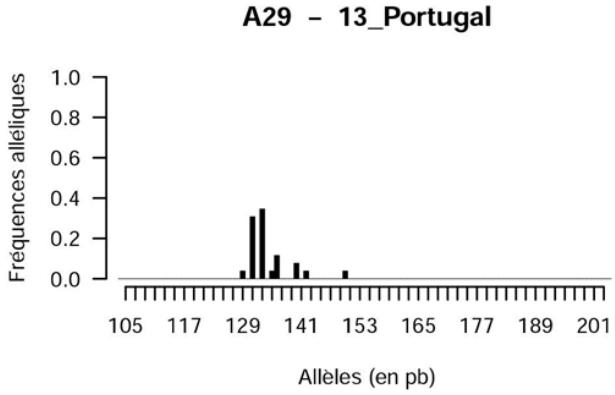

A29 – 08_Afrique du Sud
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
105 117 129 141 153 165 177 189 201
Allèles (en pb)

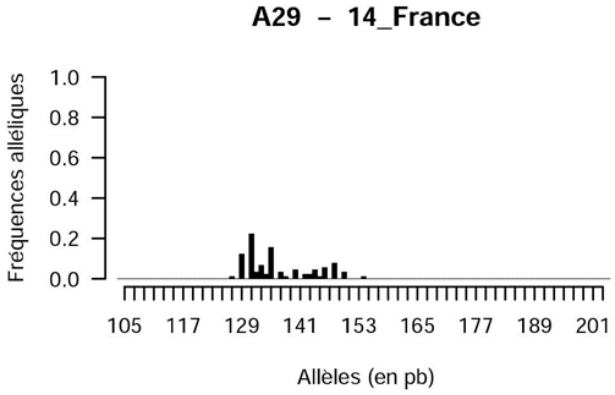

A29 – 09_São Tomé
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
105 117 129 141 153 165 177 189 201
Allèles (en pb)

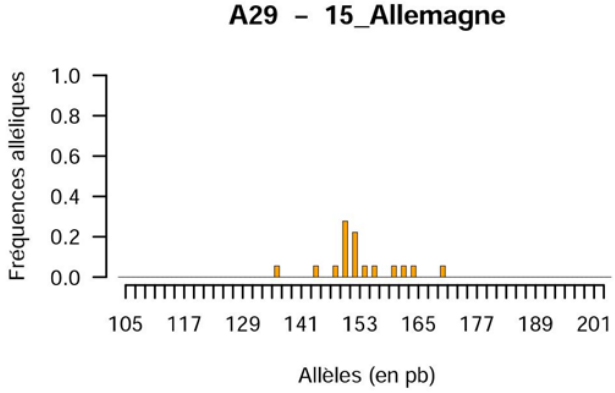

A29 – 10_Malawi
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
105 117 129 141 153 165 177 189 201
Allèles (en pb)

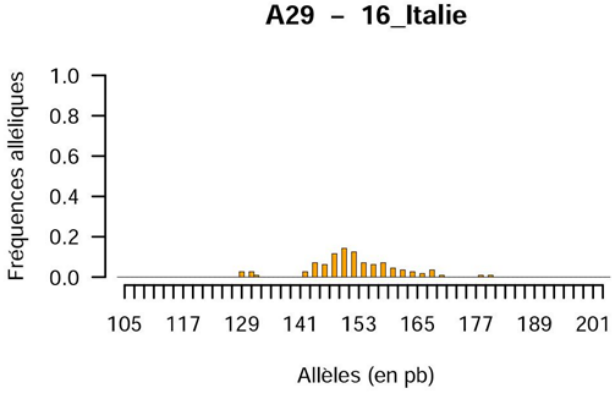

A29 – 11_Zimbabwe
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
105 117 129 141 153 165 177 189 201
Allèles (en pb)

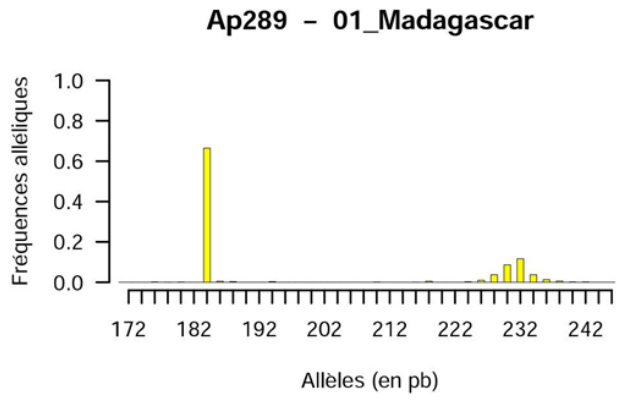

A29 – 12_République Centrafrique
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
105 117 129 141 153 165 177 189 201
Allèles (en pb)

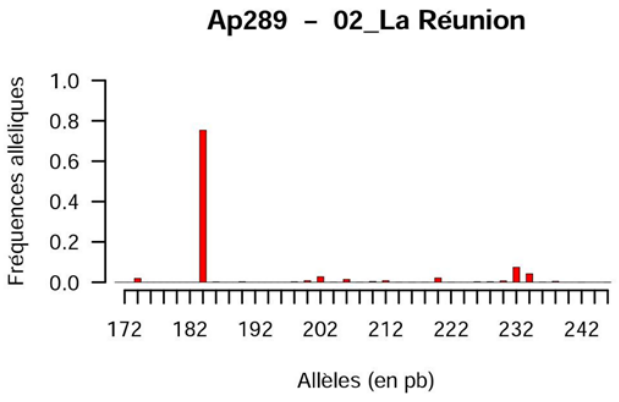

A29 – 13_Portugal
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
105 117 129 141 153 165 177 189 201
Allèles (en pb)

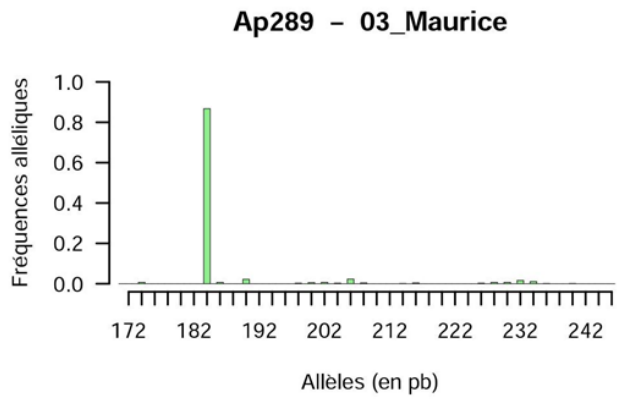

A29 – 14_France
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
105 117 129 141 153 165 177 189 201
Allèles (en pb)

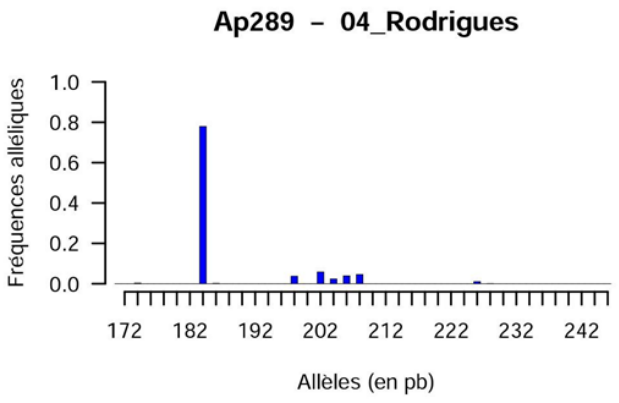

A29 – 15_Allemagne
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
105 117 129 141 153 165 177 189 201
Allèles (en pb)

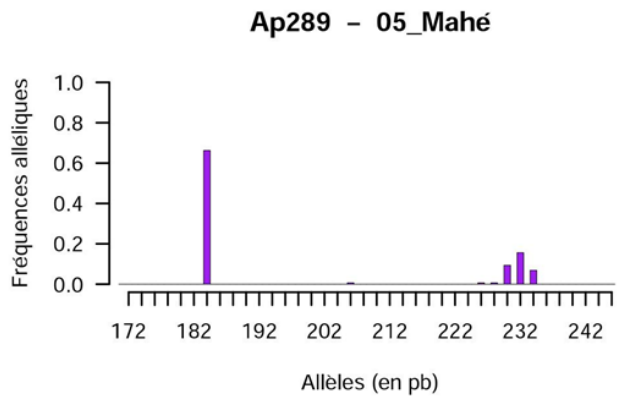

A29 – 16_Italie
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
105 117 129 141 153 165 177 189 201
Allèles (en pb)

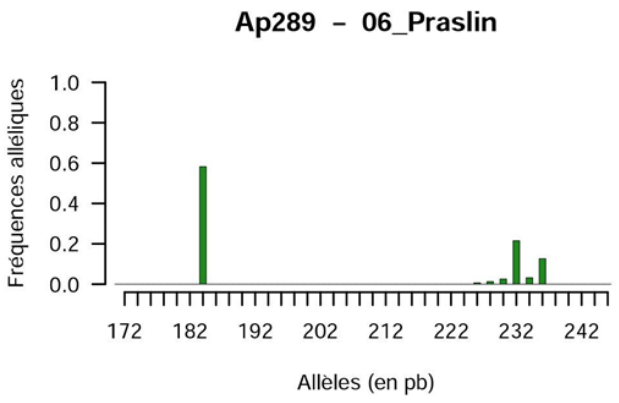

Ap289 – 01_Madagascar
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
172 182 192 202 212 222 232 242
Allèles (en pb)

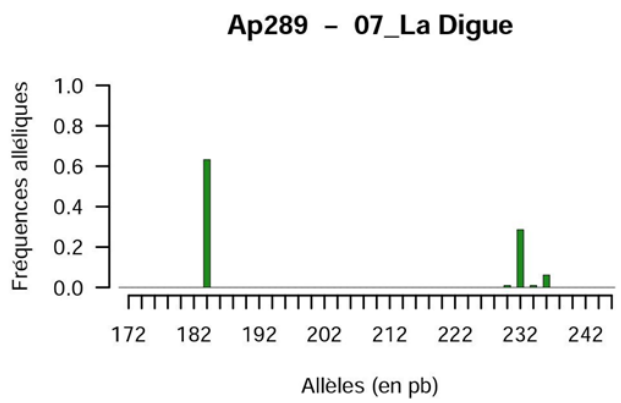

Ap289 – 02_La Réunion
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
172 182 192 202 212 222 232 242
Allèles (en pb)

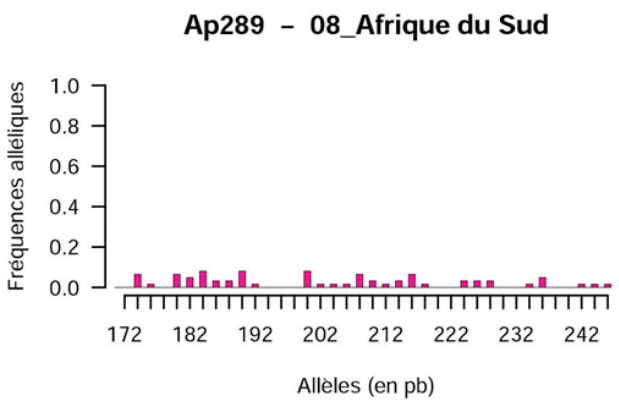

Ap289 – 03_Maurice
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
172 182 192 202 212 222 232 242
Allèles (en pb)

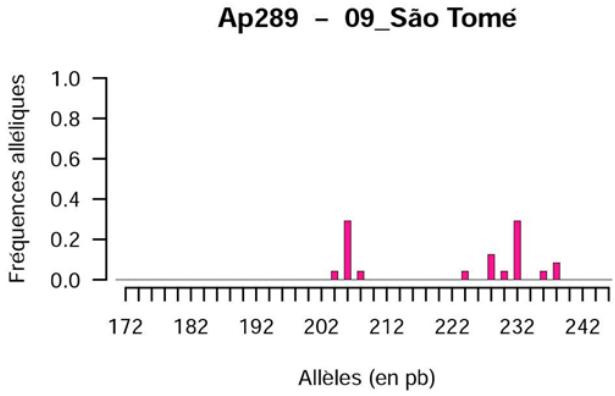

Ap289 – 04_Rodrigues
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
172 182 192 202 212 222 232 242
Allèles (en pb)

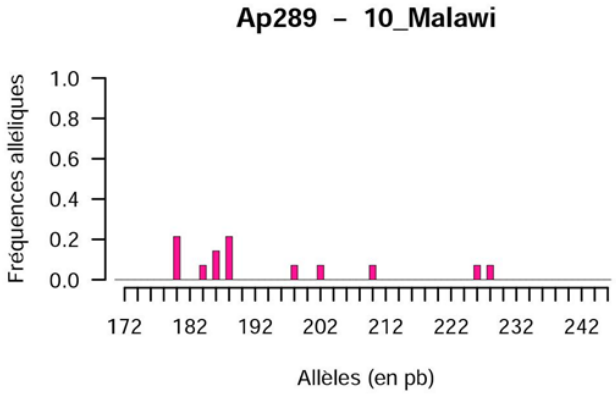

Ap289 – 05_Mahé
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
172 182 192 202 212 222 232 242
Allèles (en pb)

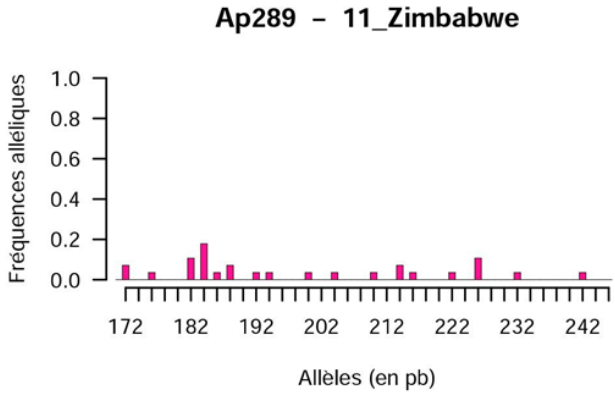

Ap289 – 06_Praslin
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
172 182 192 202 212 222 232 242
Allèles (en pb)

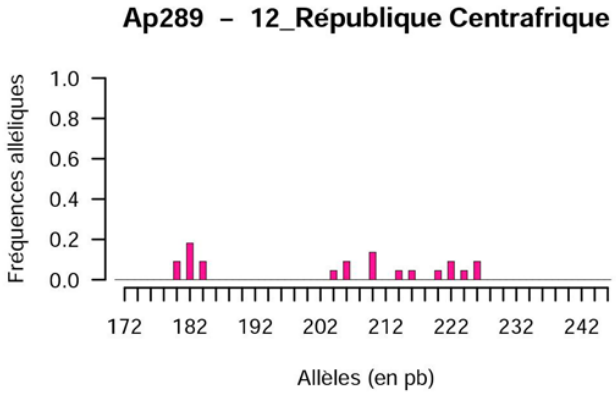

Ap289 – 07_La Digue
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
172 182 192 202 212 222 232 242
Allèles (en pb)

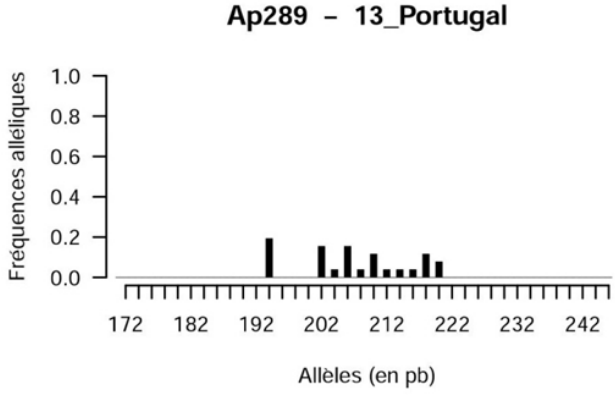

Ap289 – 08_Afrique du Sud
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
172 182 192 202 212 222 232 242
Allèles (en pb)

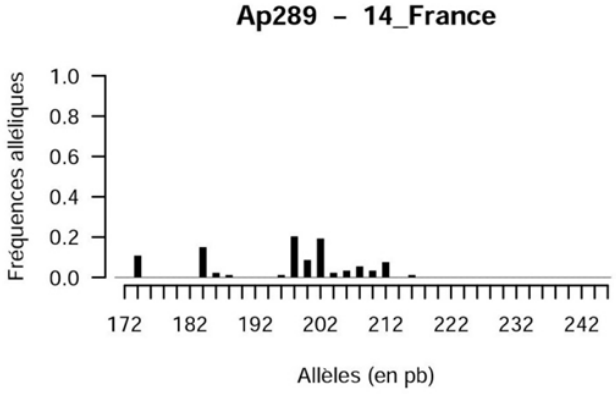

Ap289 – 09_São Tomé
Fréquences allélliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
172 182 192 202 212 222 232 242
Allèles (en pb)

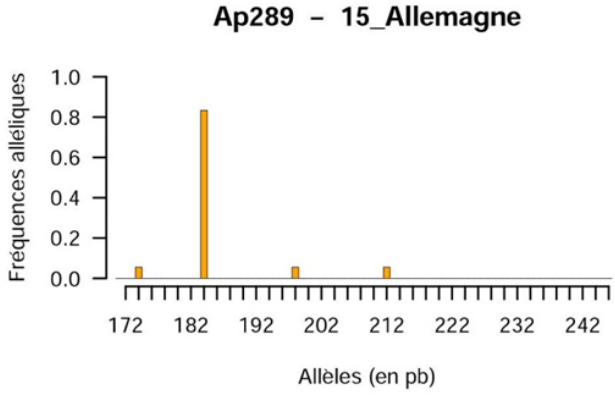

Ap289 – 10_Malawi
Fréquences allélliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
172 182 192 202 212 222 232 242
Allèles (en pb)

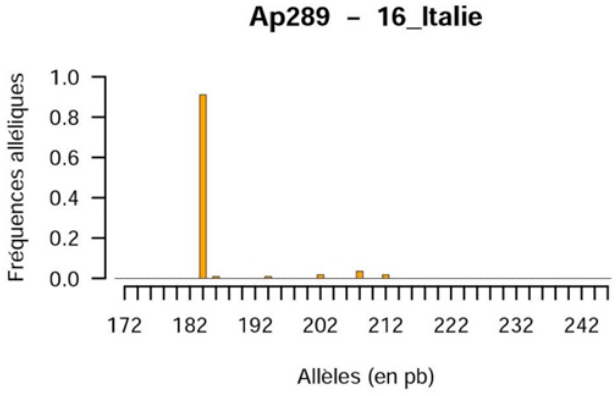

Ap289 – 11_Zimbabwe
Fréquences allélliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
172 182 192 202 212 222 232 242
Allèles (en pb)

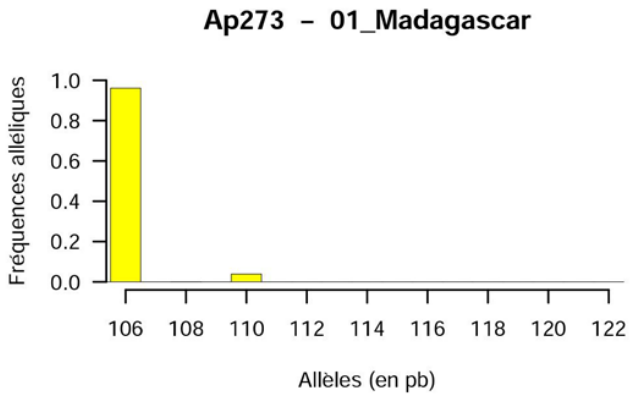

Ap289 – 12_République Centrafrique
Fréquences allélliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
172 182 192 202 212 222 232 242
Allèles (en pb)

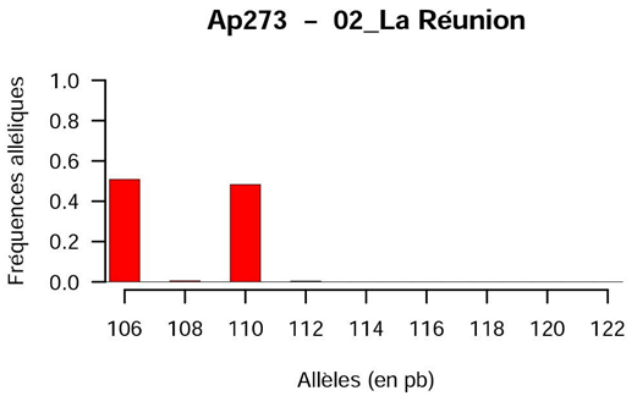

Ap289 – 13_Portugal
Fréquences allélliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
172 182 192 202 212 222 232 242
Allèles (en pb)

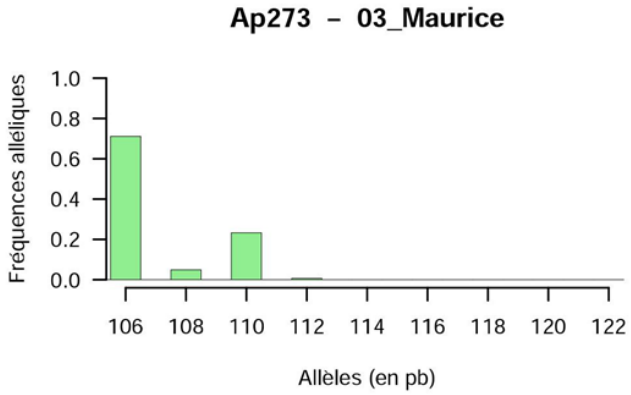

Ap289 – 14_France
Fréquences allélliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
172 182 192 202 212 222 232 242
Allèles (en pb)

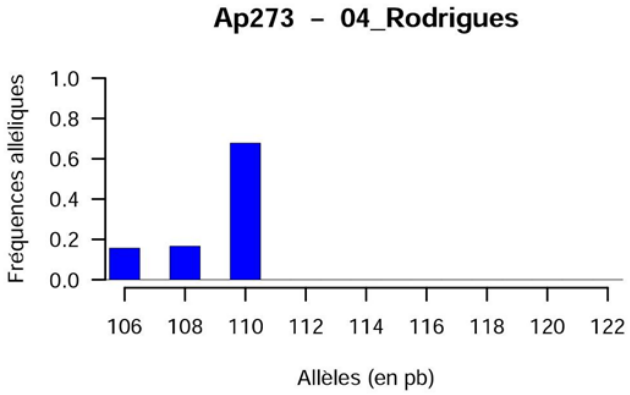

Ap289 – 15_Allemagne
Fréquences allélliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
172 182 192 202 212 222 232 242
Allèles (en pb)

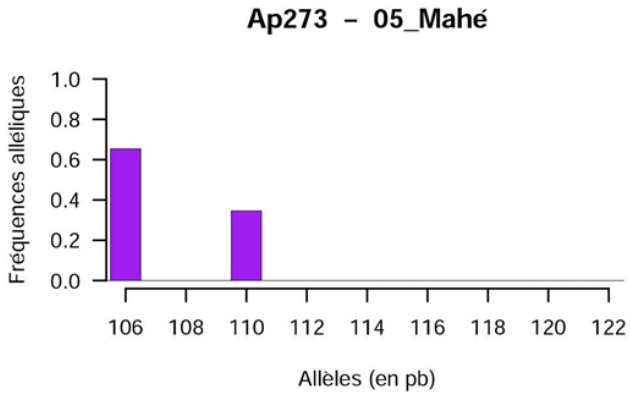

Ap289 – 16_Italie
Fréquences allélliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
172 182 192 202 212 222 232 242
Allèles (en pb)

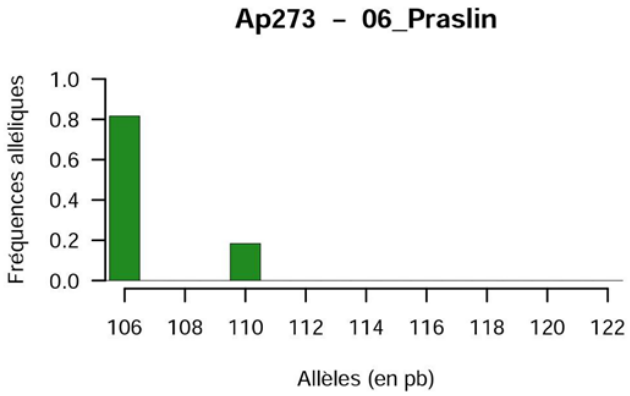

Ap273 – 01_Madagascar
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
106 108 110 112 114 116 118 120 122
Allèles (en pb)

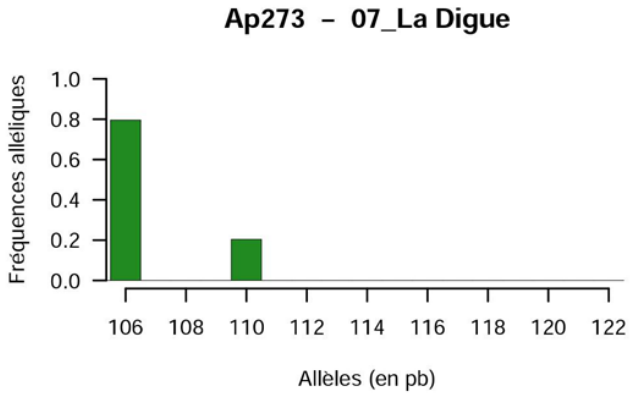

Ap273 – 02_La Réunion
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
106 108 110 112 114 116 118 120 122
Allèles (en pb)

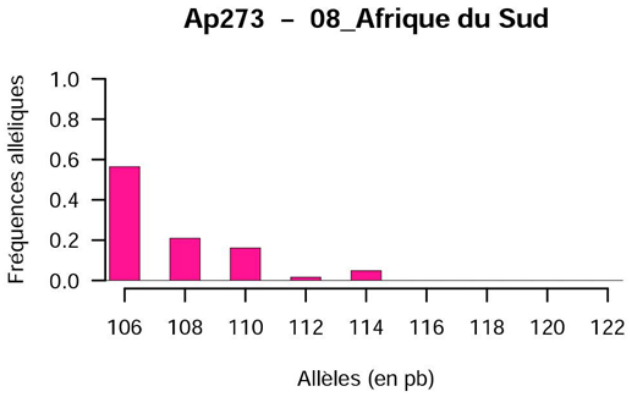

Ap273 – 03_Maurice
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
106 108 110 112 114 116 118 120 122
Allèles (en pb)

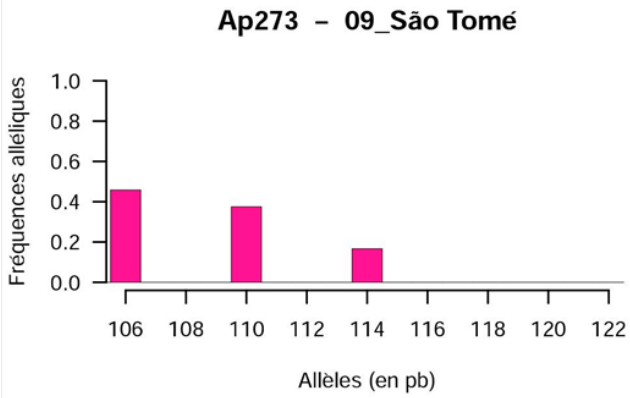

Ap273 – 04_Rodrigues
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
106 108 110 112 114 116 118 120 122
Allèles (en pb)

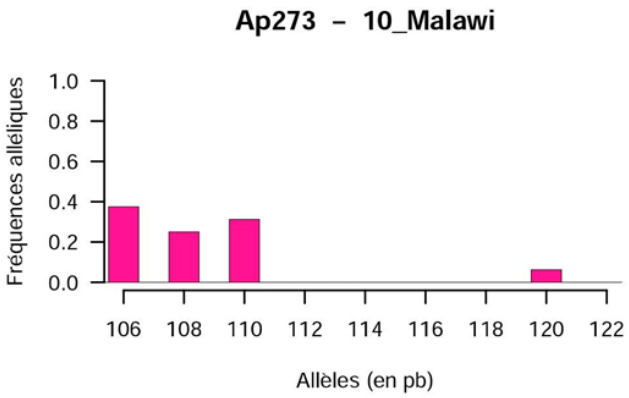

Ap273 – 05_Mahé
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
106 108 110 112 114 116 118 120 122
Allèles (en pb)

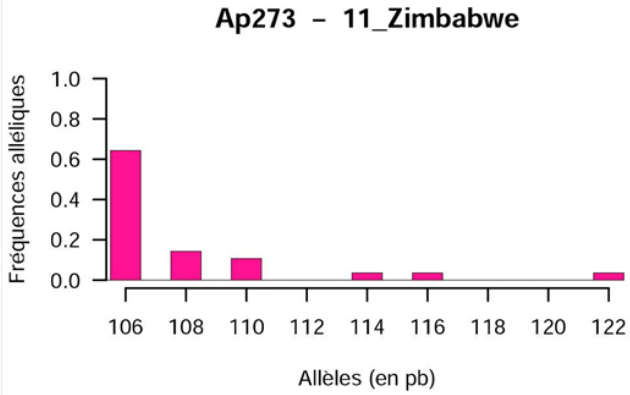

Ap273 – 06_Praslin
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
106 108 110 112 114 116 118 120 122
Allèles (en pb)

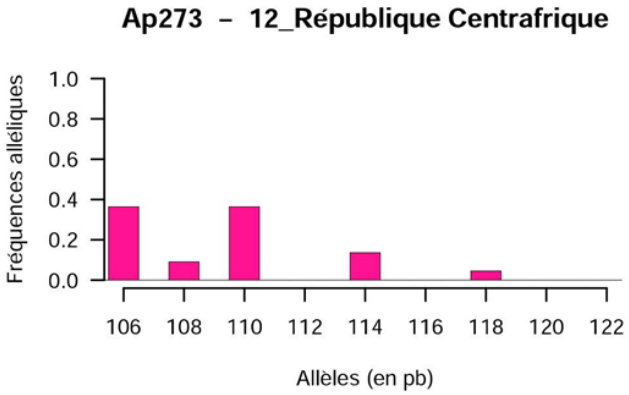

Ap273 – 07_La Digue
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
106 108 110 112 114 116 118 120 122
Allèles (en pb)

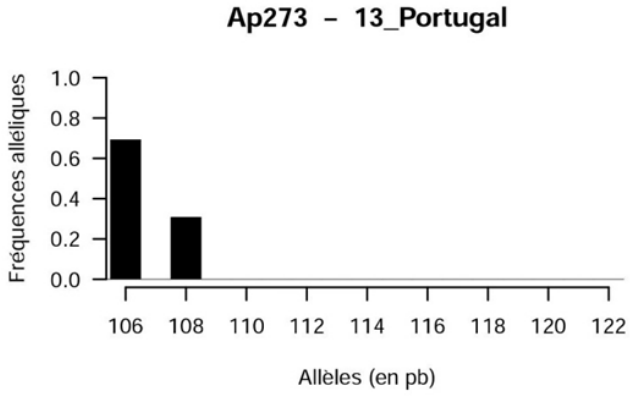

Ap273 – 08_Afrique du Sud
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
106 108 110 112 114 116 118 120 122
Allèles (en pb)

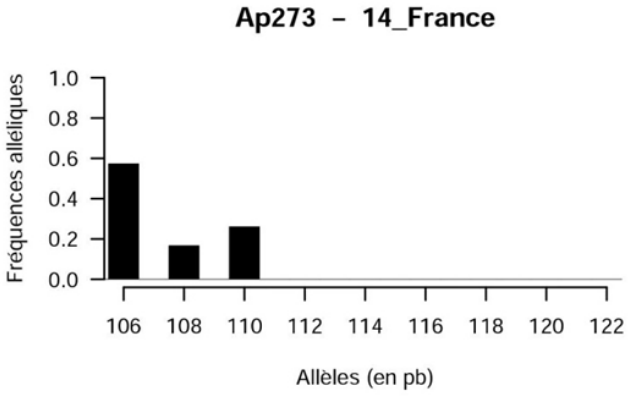

Ap273 – 09_São Tomé
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
106 108 110 112 114 116 118 120 122
Allèles (en pb)

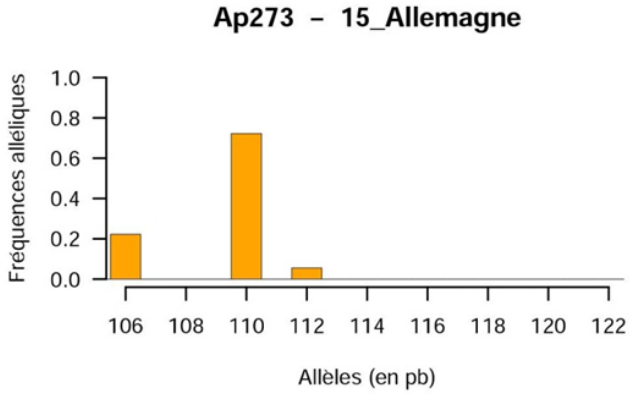

Ap273 – 10_Malawi
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
106 108 110 112 114 116 118 120 122
Allèles (en pb)

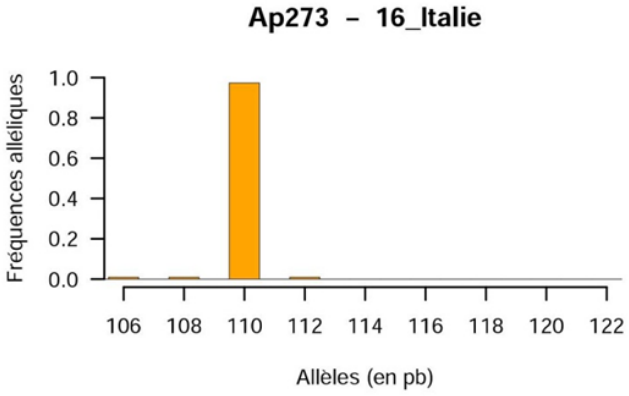

Ap273 – 11_Zimbabwe
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
106 108 110 112 114 116 118 120 122
Allèles (en pb)

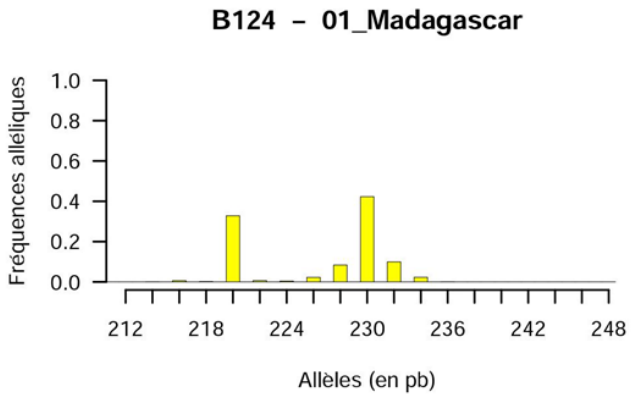

Ap273 – 12_République Centrafrique
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
106 108 110 112 114 116 118 120 122
Allèles (en pb)

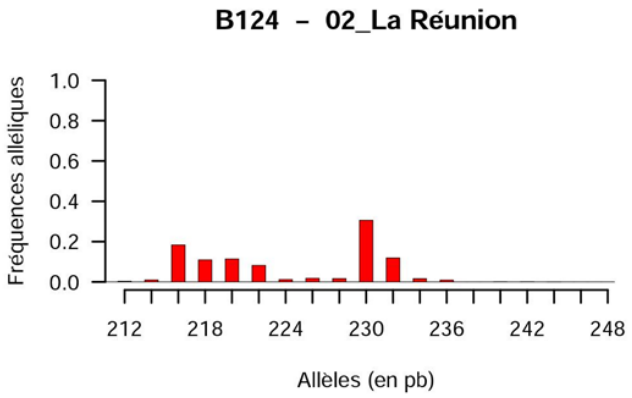

Ap273 – 13_Portugal
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
106 108 110 112 114 116 118 120 122
Allèles (en pb)

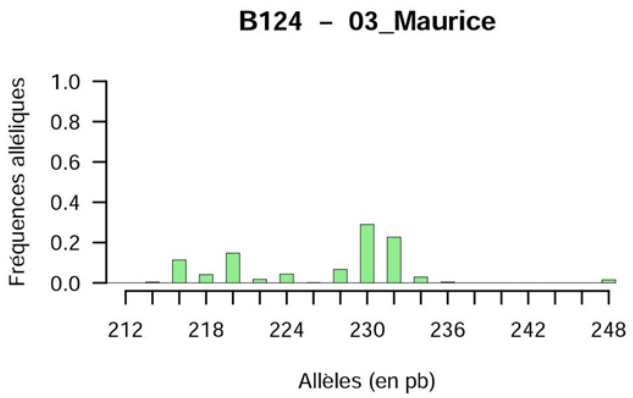

Ap273 – 14_France
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
106 108 110 112 114 116 118 120 122
Allèles (en pb)

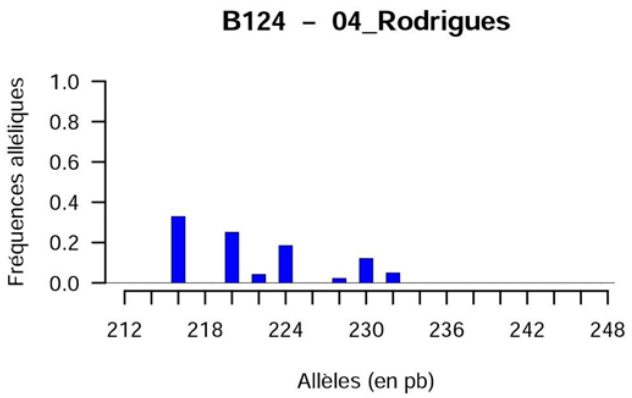

Ap273 – 15_Allemagne
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
106 108 110 112 114 116 118 120 122
Allèles (en pb)

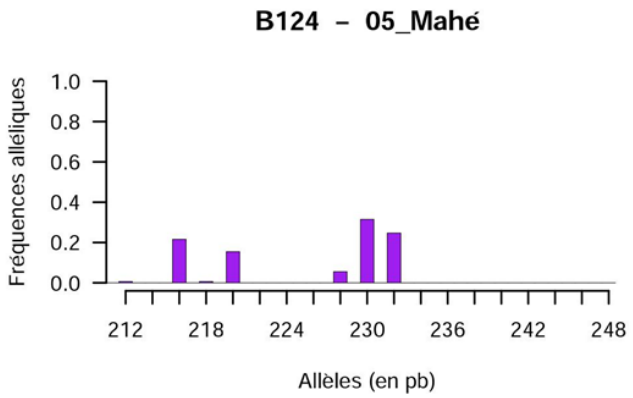

Ap273 – 16_Italie
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
106 108 110 112 114 116 118 120 122
Allèles (en pb)

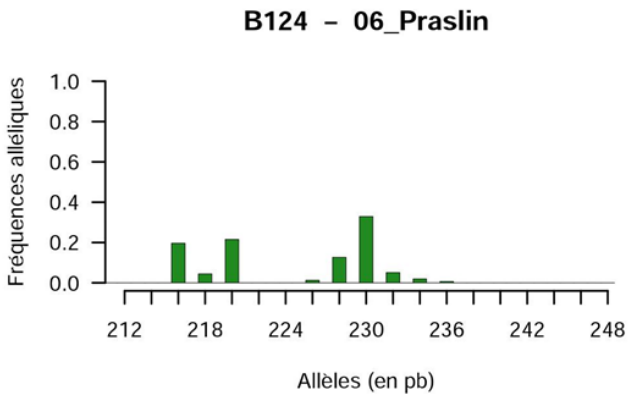

B124 – 01_Madagascar
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
212
218
224
230
236
242
248
Allèles (en pb)

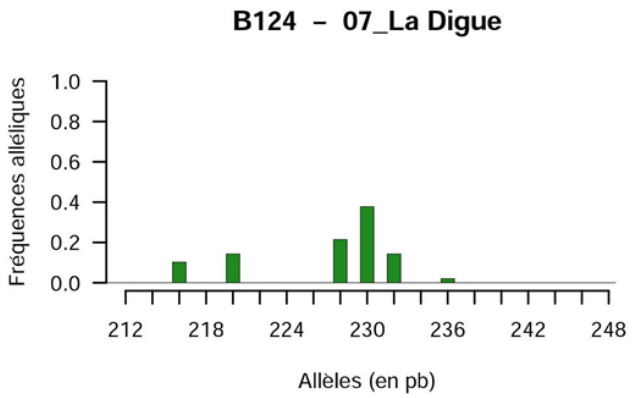

B124 – 02_La Réunion
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
212
218
224
230
236
242
248
Allèles (en pb)

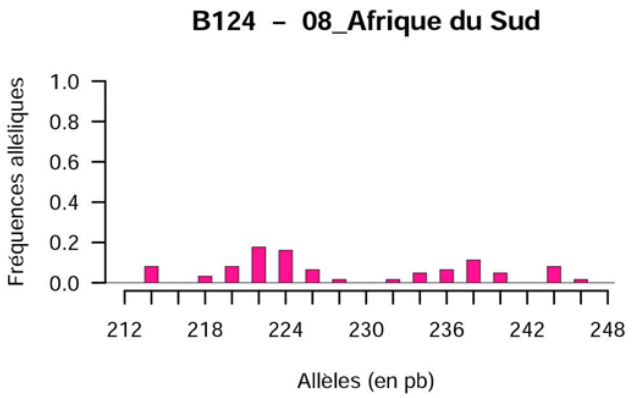

B124 – 03_Maurice
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
212
218
224
230
236
242
248
Allèles (en pb)

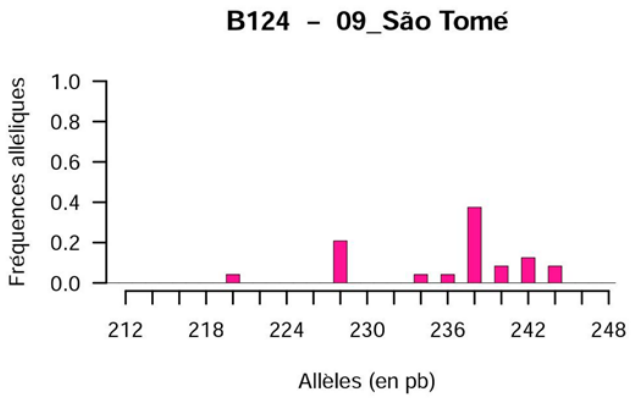

B124 – 04_Rodrigues
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
212
218
224
230
236
242
248
Allèles (en pb)

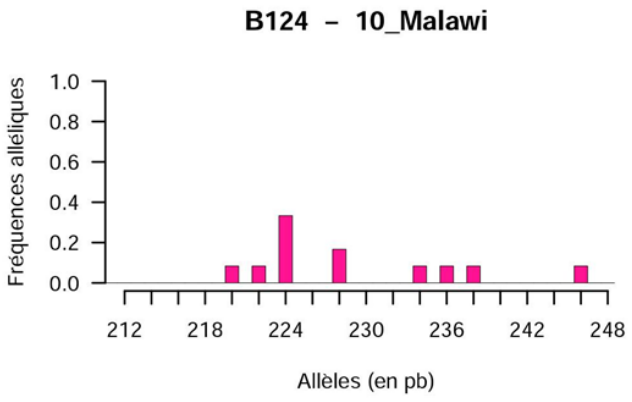

B124 – 05_Mahé
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
212
218
224
230
236
242
248
Allèles (en pb)

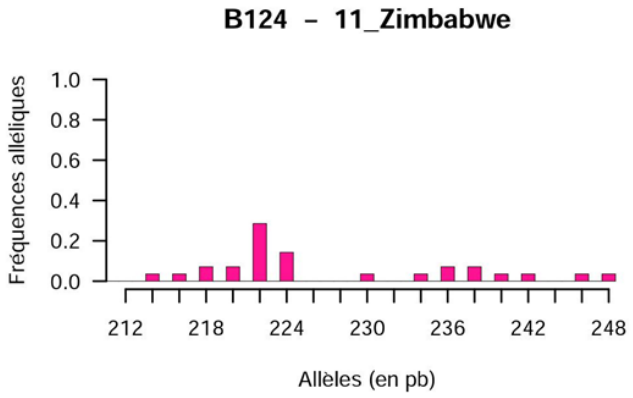

B124 – 06_Praslin
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
212
218
224
230
236
242
248
Allèles (en pb)

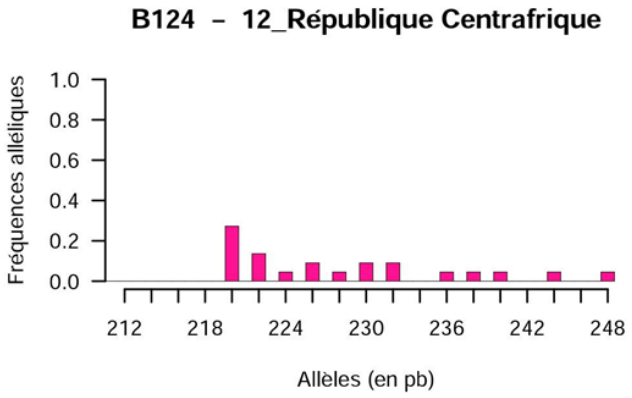

B124 – 07_La Digue
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
212
218
224
230
236
242
248
Allèles (en pb)

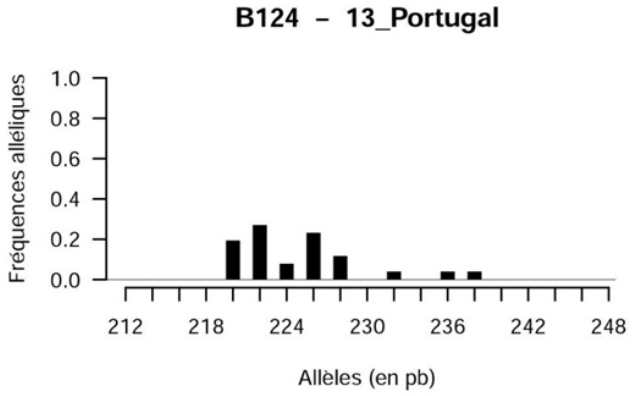

B124 – 08_Afrique du Sud
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
212
218
224
230
236
242
248
Allèles (en pb)

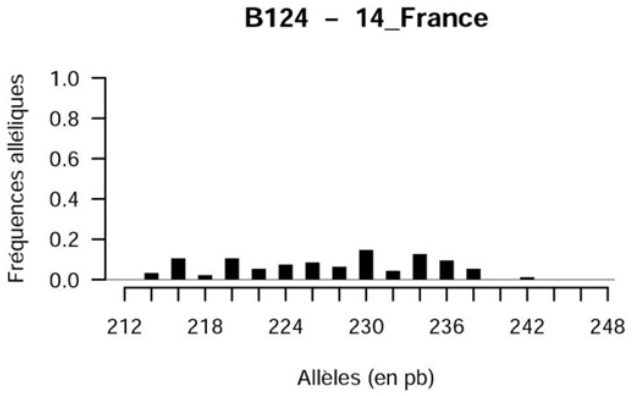

B124 – 09_São Tomé
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
212
218
224
230
236
242
248
Allèles (en pb)

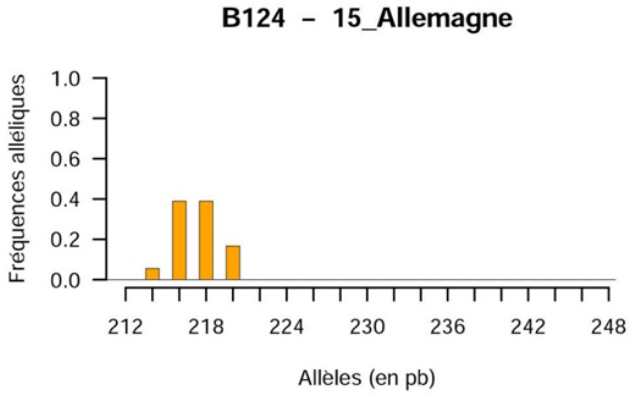

B124 – 10_Malawi
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
212
218
224
230
236
242
248
Allèles (en pb)

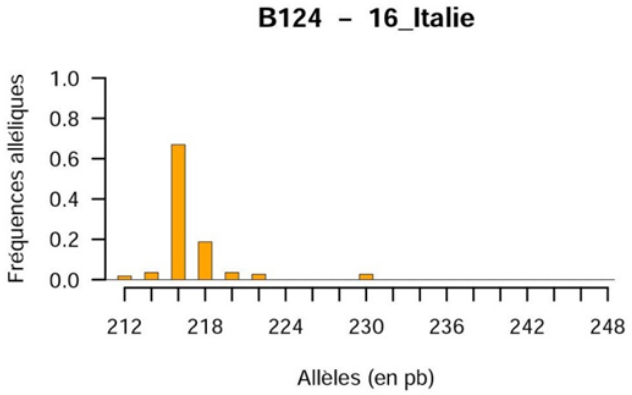

B124 – 11_Zimbabwe
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
212
218
224
230
236
242
248
Allèles (en pb)

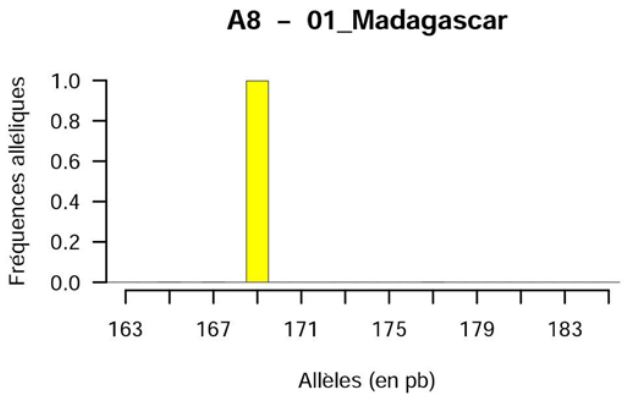

B124 – 12_République Centrafrique
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
212
218
224
230
236
242
248
Allèles (en pb)

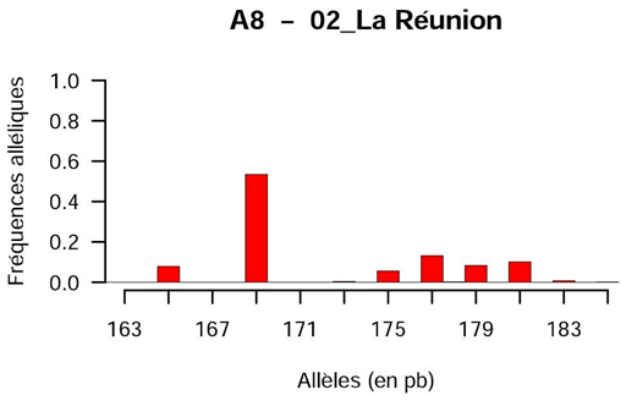

B124 – 13_Portugal
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
212
218
224
230
236
242
248
Allèles (en pb)

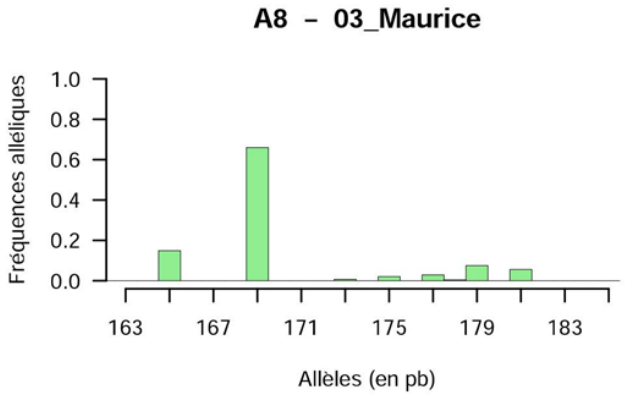

B124 – 14_France
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
212
218
224
230
236
242
248
Allèles (en pb)

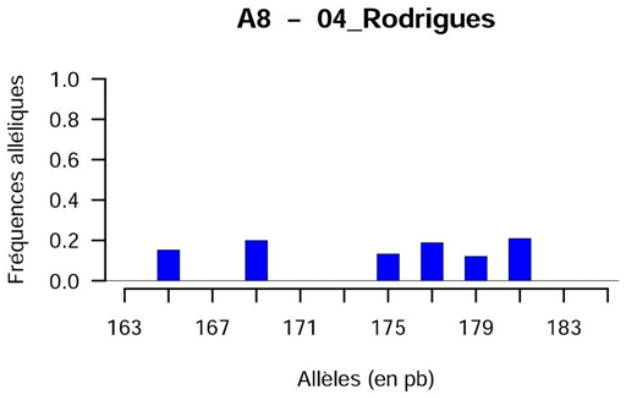

B124 – 15_Allemagne
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
212
218
224
230
236
242
248
Allèles (en pb)

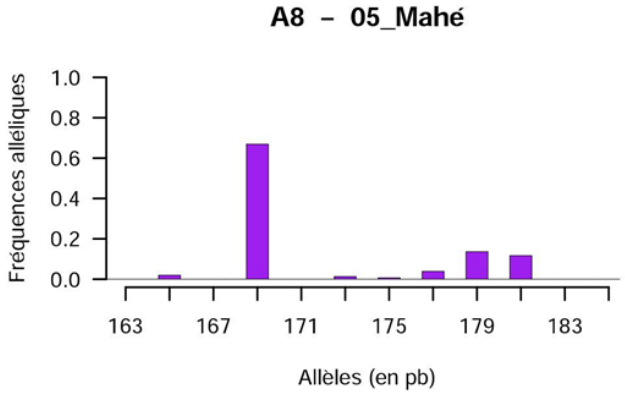

B124 – 16_Italie
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
212
218
224
230
236
242
248
Allèles (en pb)

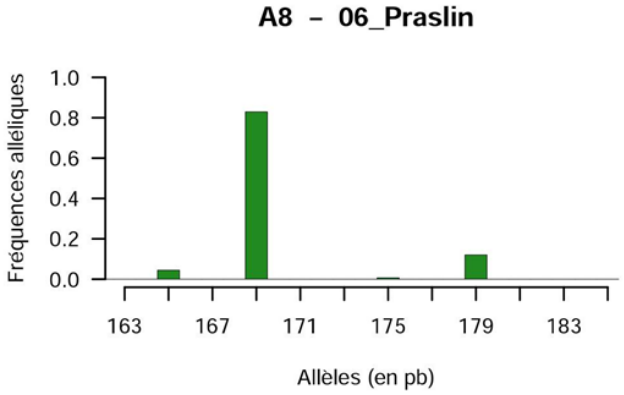

A8 – 01_Madagascar
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
163
167
171
175
179
183
Allèles (en pb)

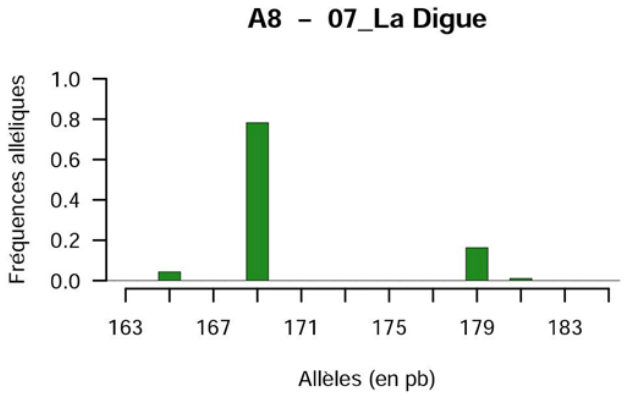

A8 – 02_La Réunion
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
163
167
171
175
179
183
Allèles (en pb)

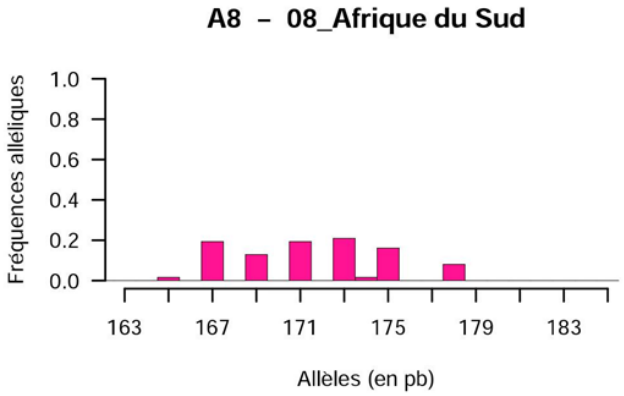

A8 – 03_Maurice
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
163
167
171
175
179
183
Allèles (en pb)

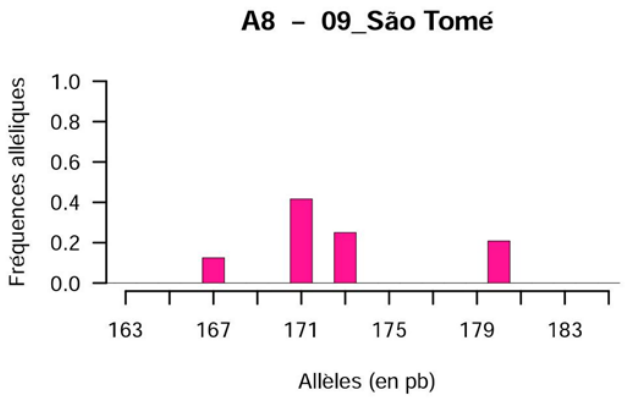

A8 – 04_Rodrigues
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
163
167
171
175
179
183
Allèles (en pb)

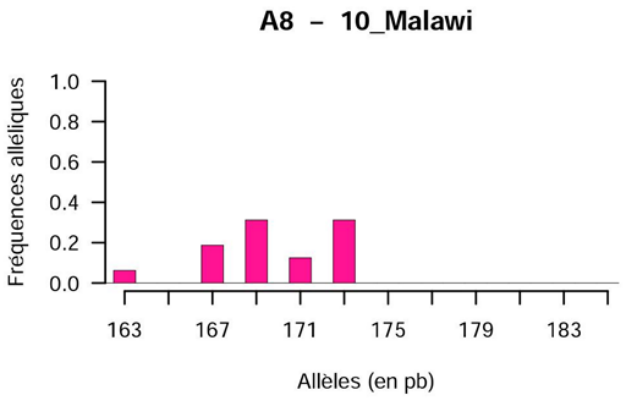

A8 – 05_Mahé
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
163
167
171
175
179
183
Allèles (en pb)

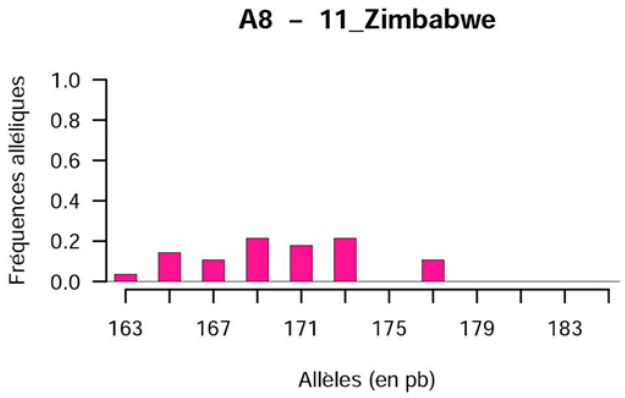

A8 – 06_Praslin
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
163
167
171
175
179
183
Allèles (en pb)

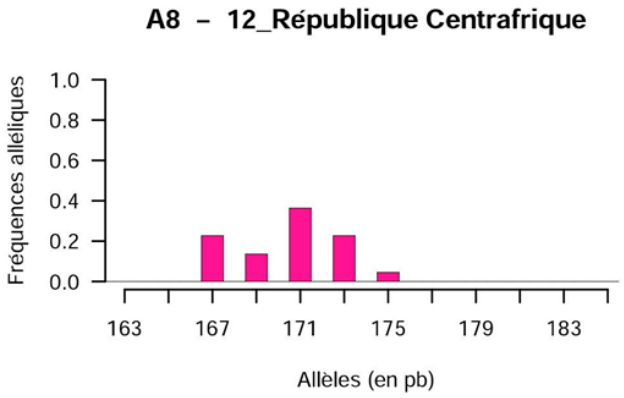

A8 – 07_La Digue
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
163
167
171
175
179
183
Allèles (en pb)

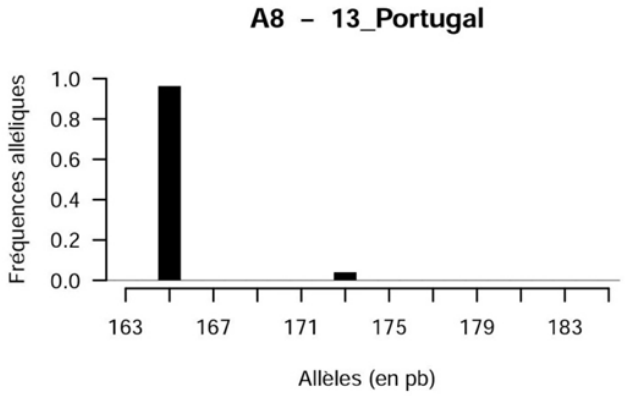

A8 – 08_Afrique du Sud
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
163
167
171
175
179
183
Allèles (en pb)

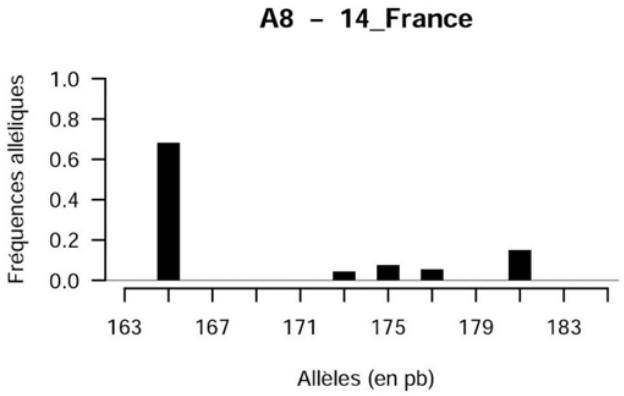

A8 – 09_São Tomé
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
163
167
171
175
179
183
Allèles (en pb)

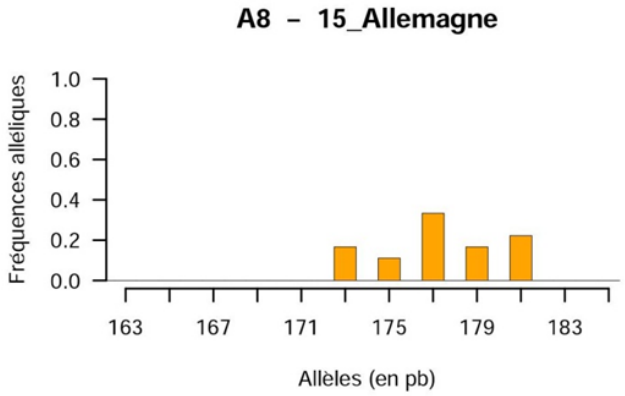

A8 – 10_Malawi
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
163
167
171
175
179
183
Allèles (en pb)

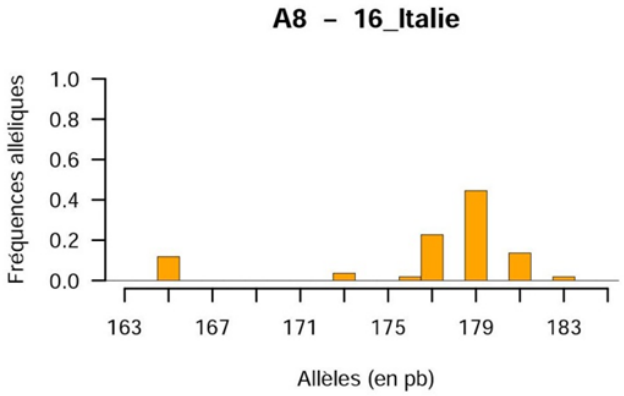

A8 – 11_Zimbabwe
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
163
167
171
175
179
183
Allèles (en pb)

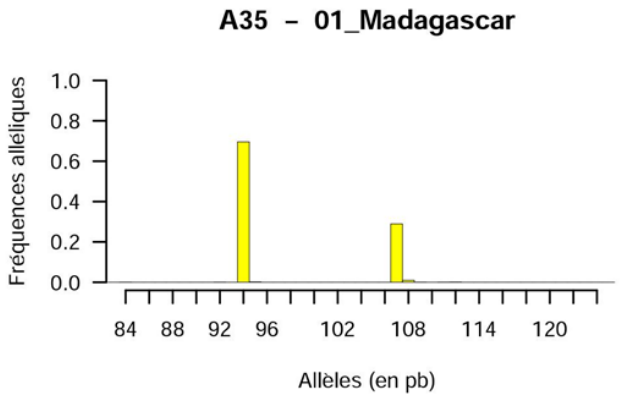

A8 – 12_République Centrafrique
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
163
167
171
175
179
183
Allèles (en pb)

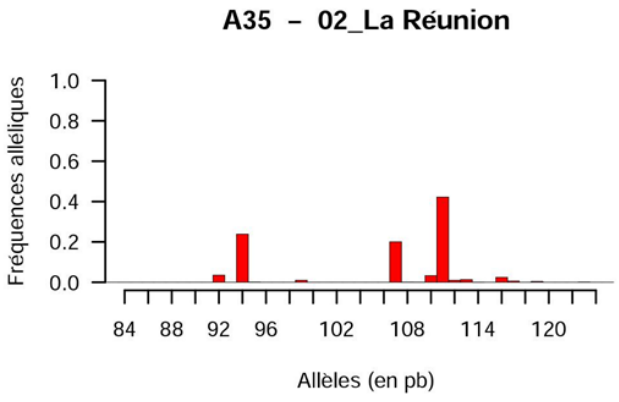

A8 – 13_Portugal
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
163
167
171
175
179
183
Allèles (en pb)

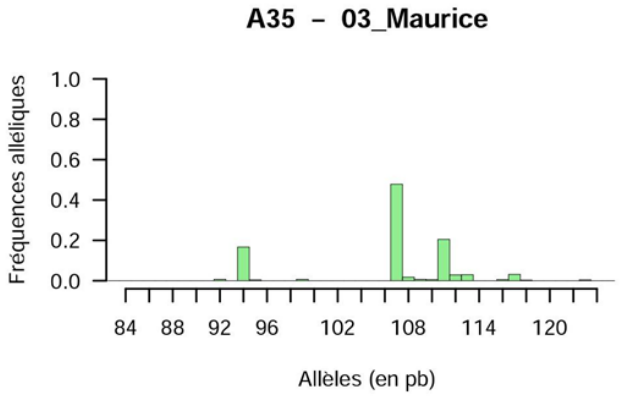

A8 – 14_France
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
163
167
171
175
179
183
Allèles (en pb)

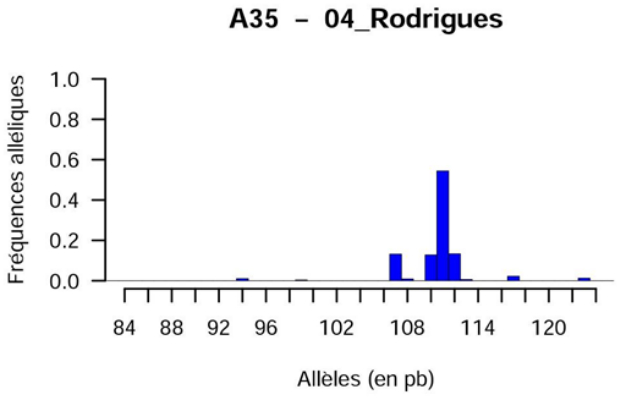

A8 – 15_Allemagne
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
163
167
171
175
179
183
Allèles (en pb)

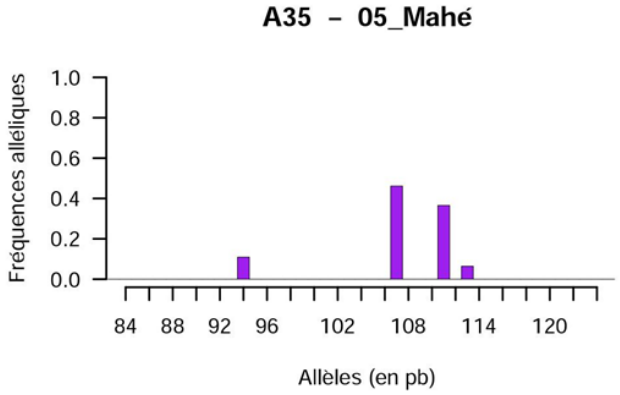

A8 – 16_Italie
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
163
167
171
175
179
183
Allèles (en pb)

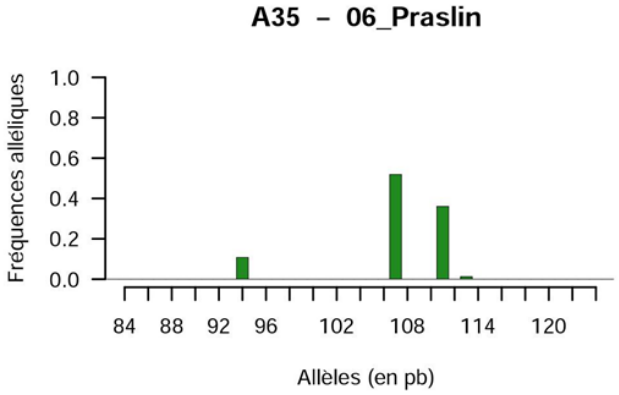

A35 – 01_Madagascar
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
84 88 92 96 102 108 114 120
Allèles (en pb)

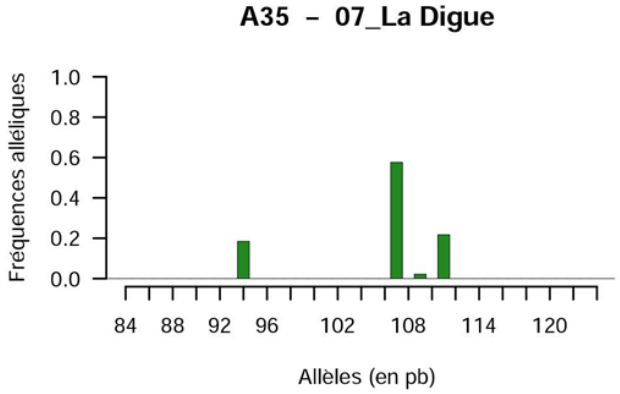

A35 – 02_La Réunion
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
84 88 92 96 102 108 114 120
Allèles (en pb)

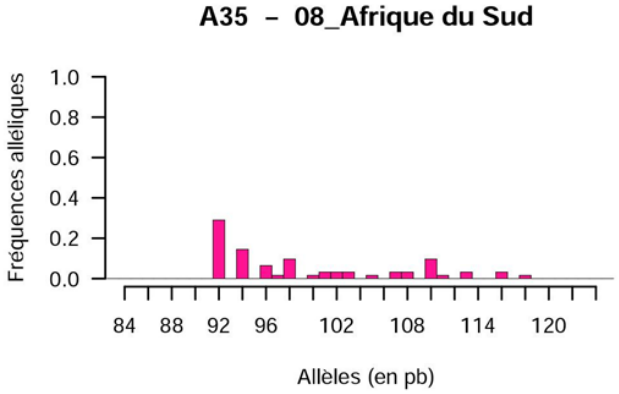

A35 – 03_Maurice
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
84 88 92 96 102 108 114 120
Allèles (en pb)

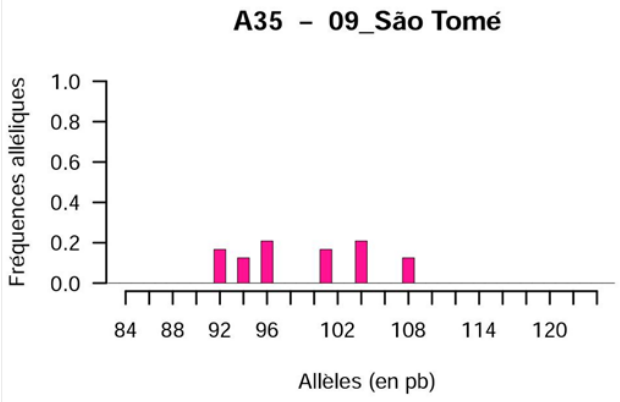

A35 – 04_Rodrigues
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
84 88 92 96 102 108 114 120
Allèles (en pb)

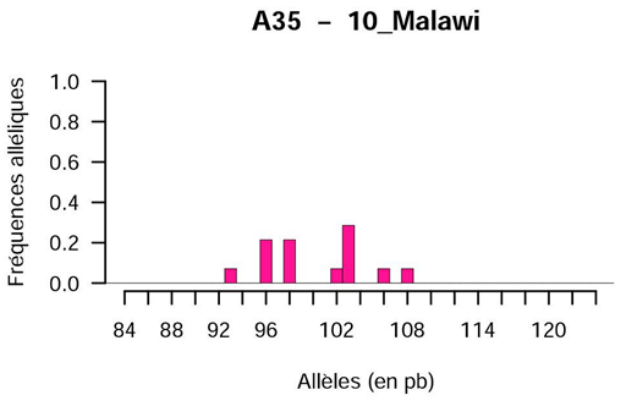

A35 – 05_Mahé
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
84 88 92 96 102 108 114 120
Allèles (en pb)

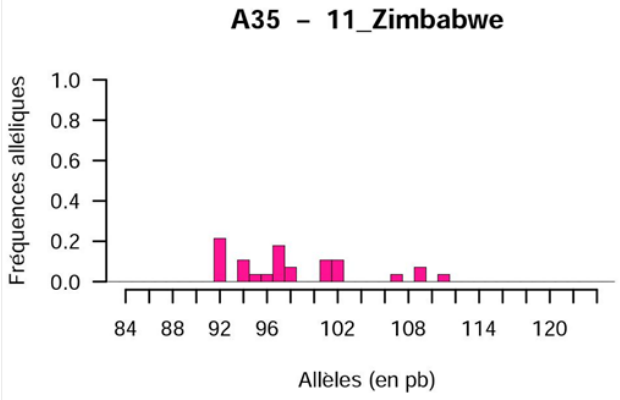

A35 – 06_Praslin
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
84 88 92 96 102 108 114 120
Allèles (en pb)

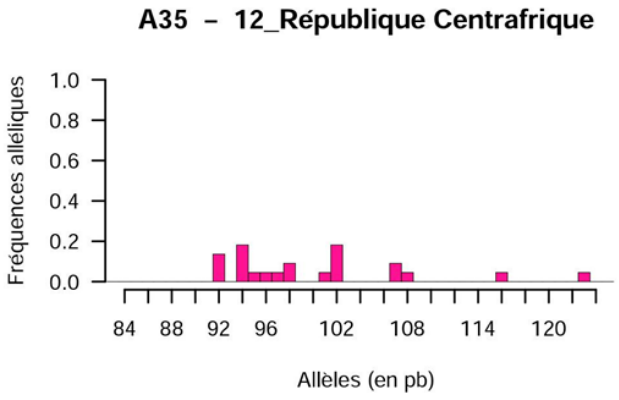

A35 – 07_La Digue
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
84 88 92 96 102 108 114 120
Allèles (en pb)

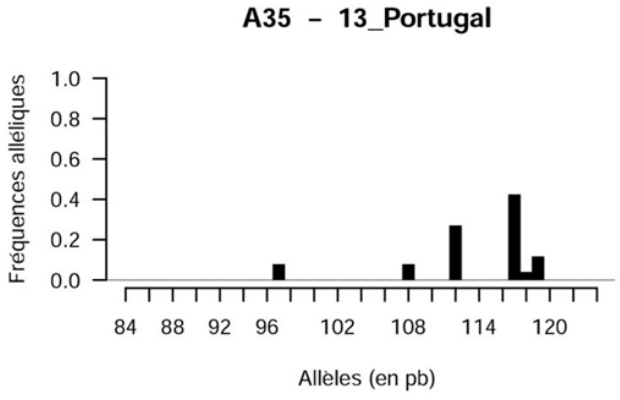

A35 – 08_Afrique du Sud
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
84 88 92 96 102 108 114 120
Allèles (en pb)

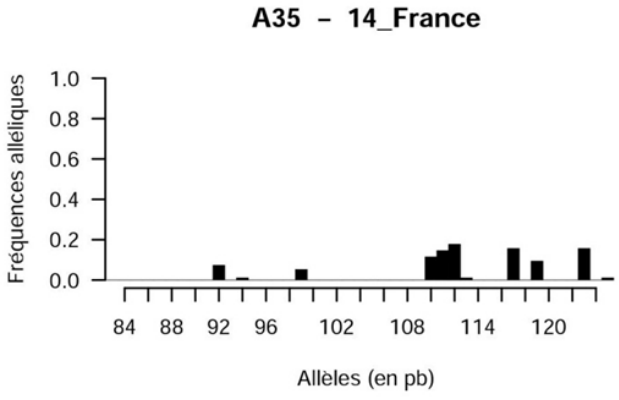

A35 – 09_São Tomé
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
84 88 92 96 102 108 114 120
Allèles (en pb)

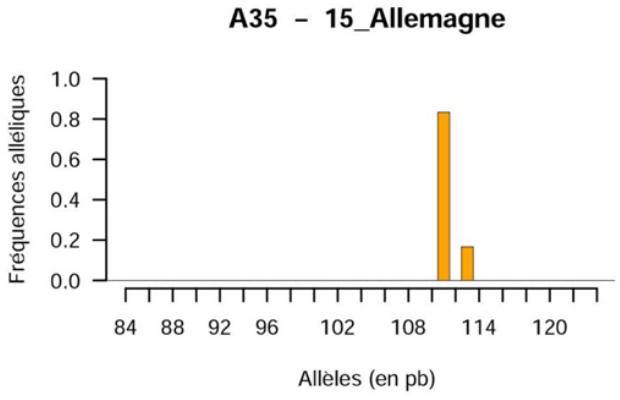

A35 – 10_Malawi
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
84 88 92 96 102 108 114 120
Allèles (en pb)

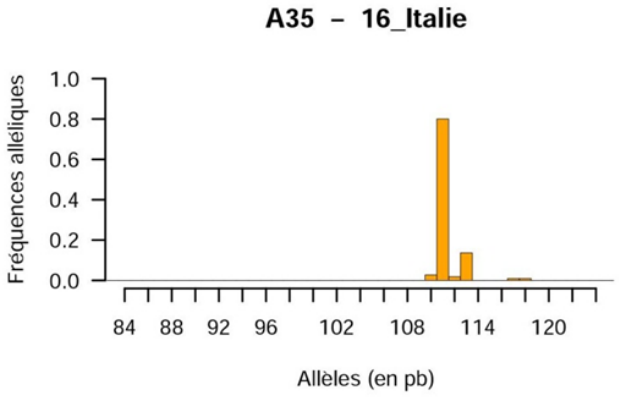

A35 – 11_Zimbabwe
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
84 88 92 96 102 108 114 120
Allèles (en pb)

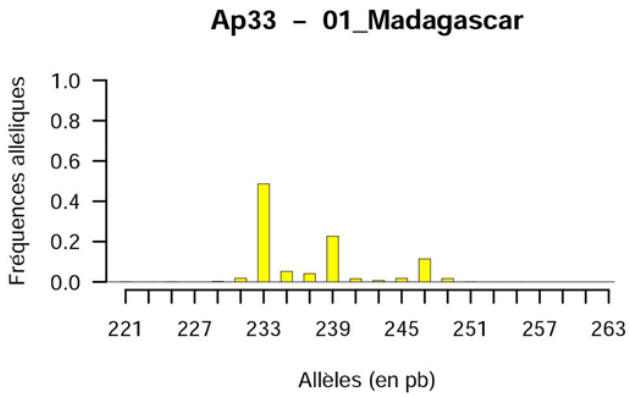

A35 – 12_République Centrafrique
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
84 88 92 96 102 108 114 120
Allèles (en pb)

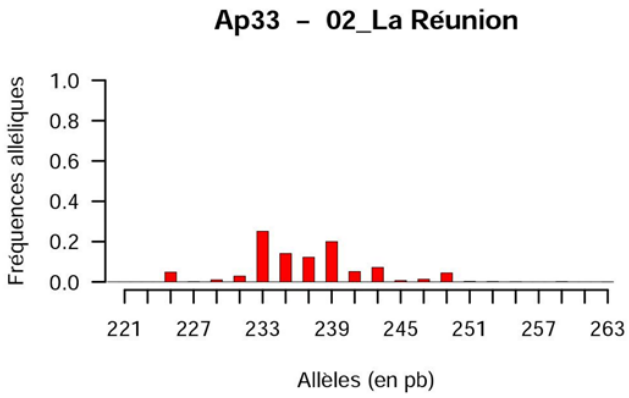

A35 – 13_Portugal
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
84 88 92 96 102 108 114 120
Allèles (en pb)

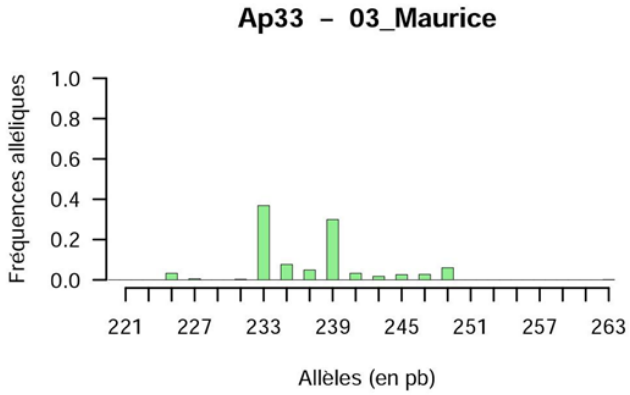

A35 – 14_France
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
84 88 92 96 102 108 114 120
Allèles (en pb)

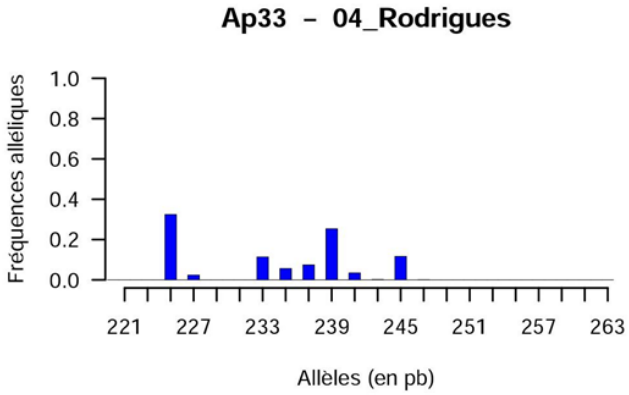

A35 – 15_Allemagne
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
84 88 92 96 102 108 114 120
Allèles (en pb)

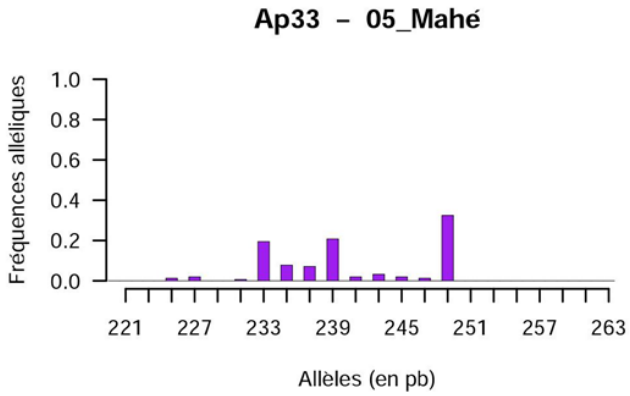

A35 – 16_Italie
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
84 88 92 96 102 108 114 120
Allèles (en pb)

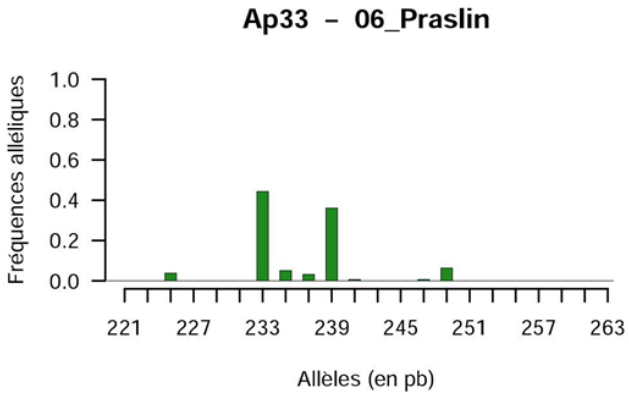

Ap33 – 01_Madagascar
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
221 227 233 239 245 251 257 263
Allèles (en pb)

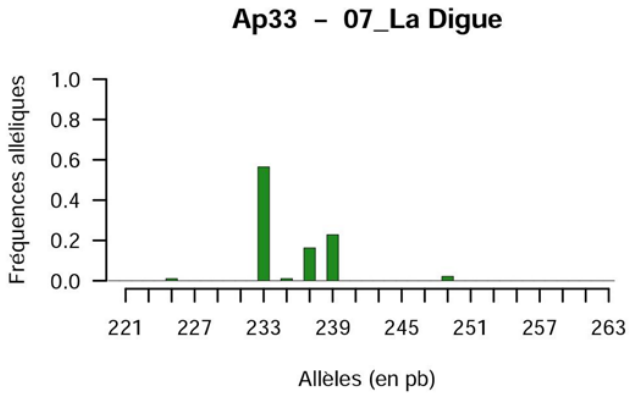

Ap33 – 02_La Réunion
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
221 227 233 239 245 251 257 263
Allèles (en pb)

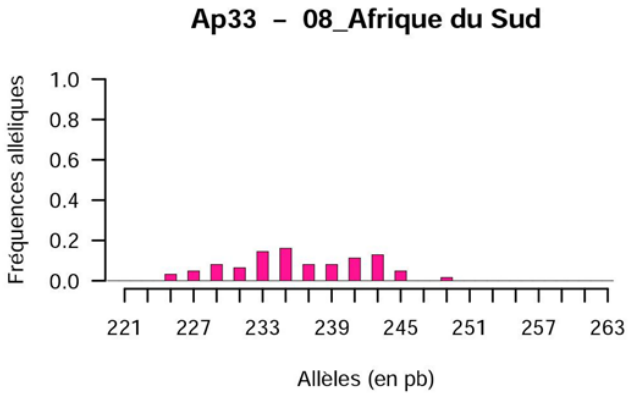

Ap33 – 03_Maurice
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
221 227 233 239 245 251 257 263
Allèles (en pb)

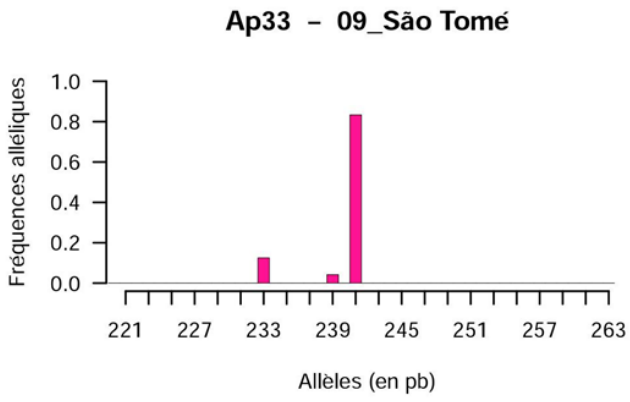

Ap33 – 04_Rodrigues
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
221 227 233 239 245 251 257 263
Allèles (en pb)

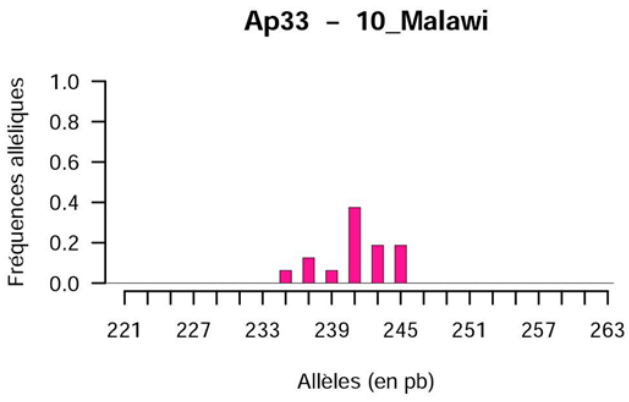

Ap33 – 05_Mahé
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
221 227 233 239 245 251 257 263
Allèles (en pb)

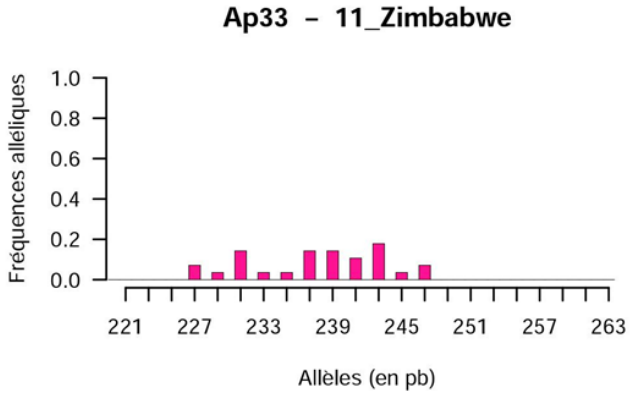

Ap33 – 06_Praslin
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
221 227 233 239 245 251 257 263
Allèles (en pb)

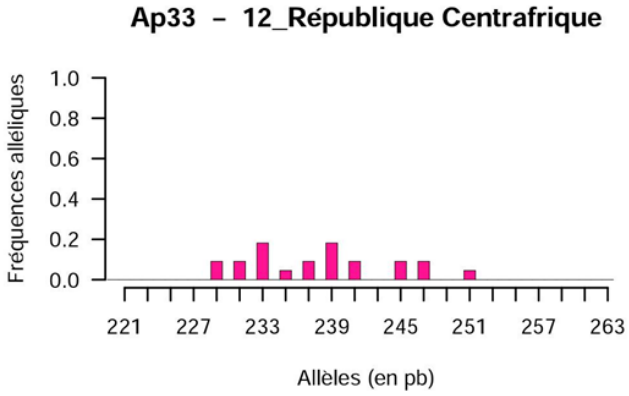

Ap33 – 07_La Digue
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
221 227 233 239 245 251 257 263
Allèles (en pb)

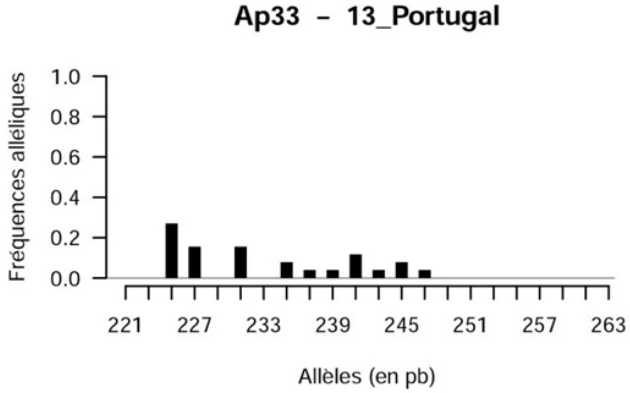

Ap33 – 08_Afrique du Sud
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
221 227 233 239 245 251 257 263
Allèles (en pb)

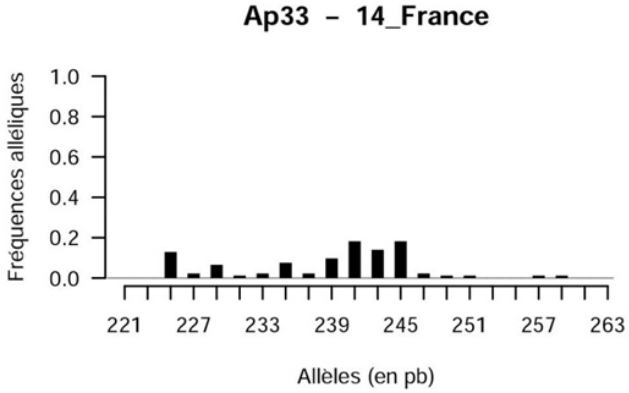

Ap33 – 09_São Tomé
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
221 227 233 239 245 251 257 263
Allèles (en pb)

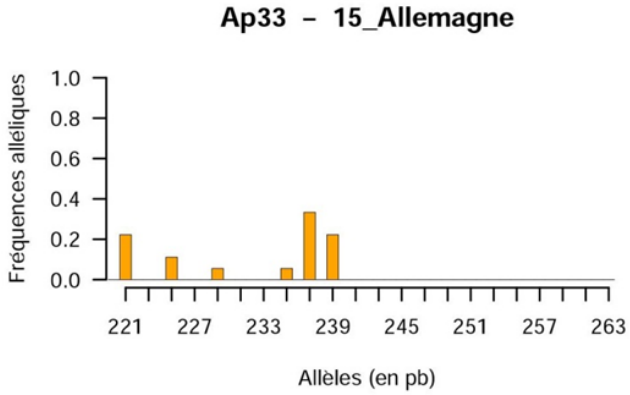

Ap33 – 10_Malawi
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
221 227 233 239 245 251 257 263
Allèles (en pb)

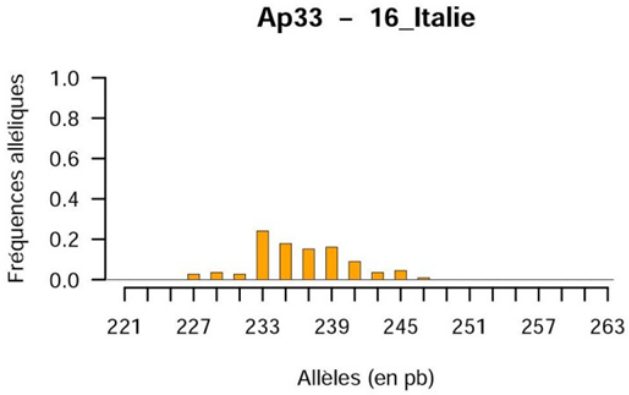

Ap33 – 11_Zimbabwe
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
221 227 233 239 245 251 257 263
Allèles (en pb)

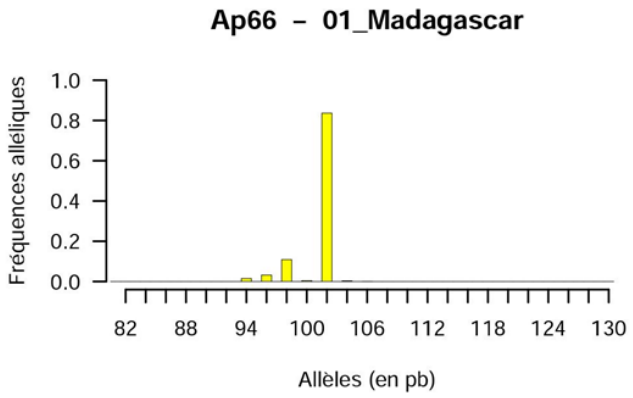

Ap33 – 12_République Centrafrique
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
221 227 233 239 245 251 257 263
Allèles (en pb)

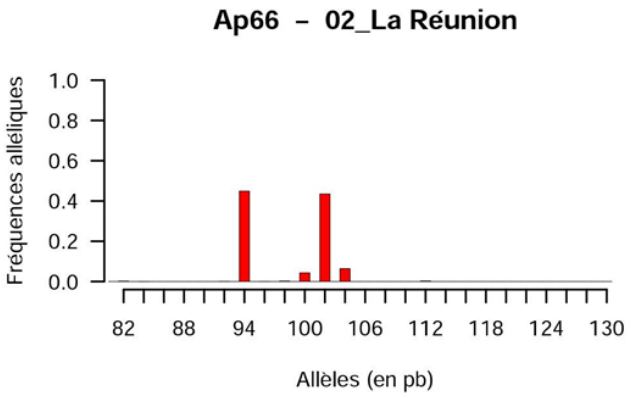

Ap33 – 13_Portugal
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
221 227 233 239 245 251 257 263
Allèles (en pb)

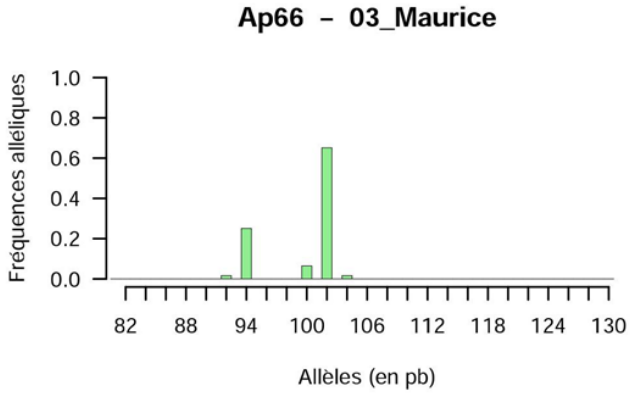

Ap33 – 14_France
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
221 227 233 239 245 251 257 263
Allèles (en pb)

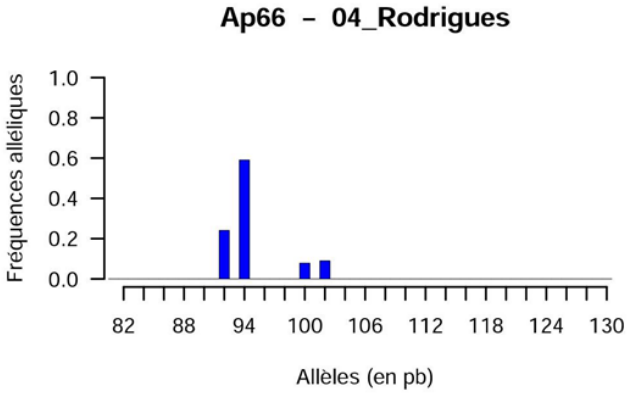

Ap33 – 15_Allemagne
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
221 227 233 239 245 251 257 263
Allèles (en pb)

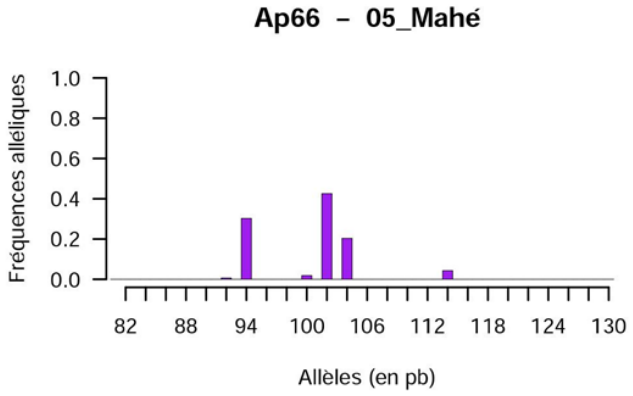

Ap33 – 16_Italie
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
221 227 233 239 245 251 257 263
Allèles (en pb)

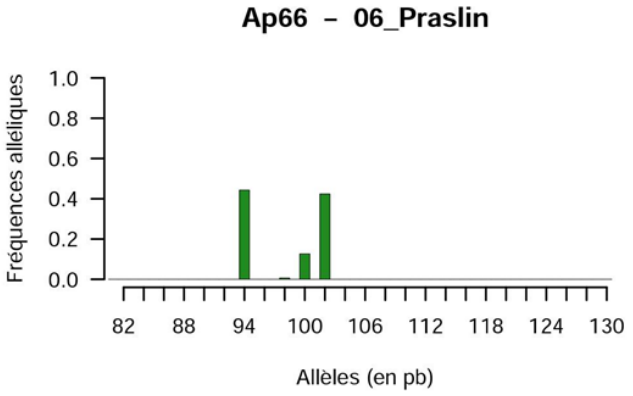

Ap66 – 01_Madagascar
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
82 88 94 100 106 112 118 124 130
Allèles (en pb)

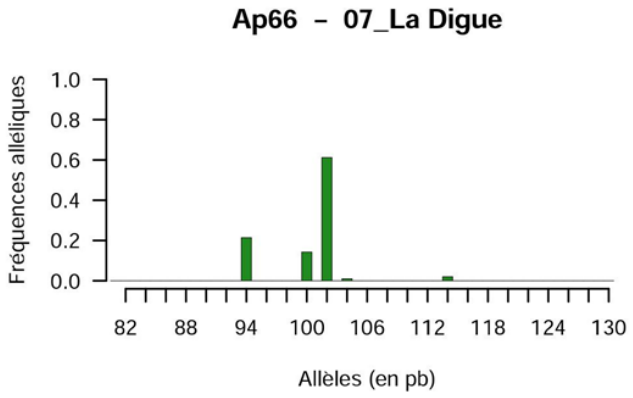

Ap66 – 02_La Réunion
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
82 88 94 100 106 112 118 124 130
Allèles (en pb)

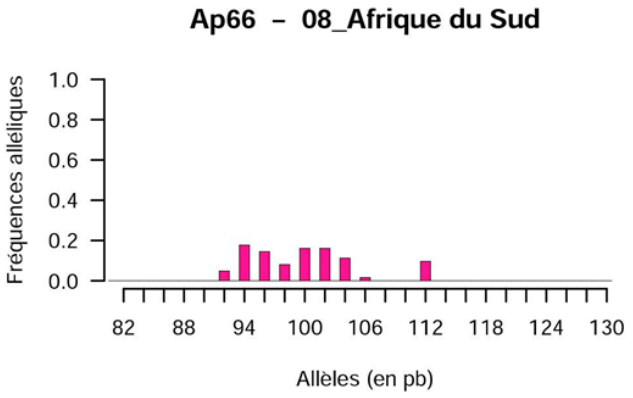

Ap66 – 03_Maurice
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
82 88 94 100 106 112 118 124 130
Allèles (en pb)

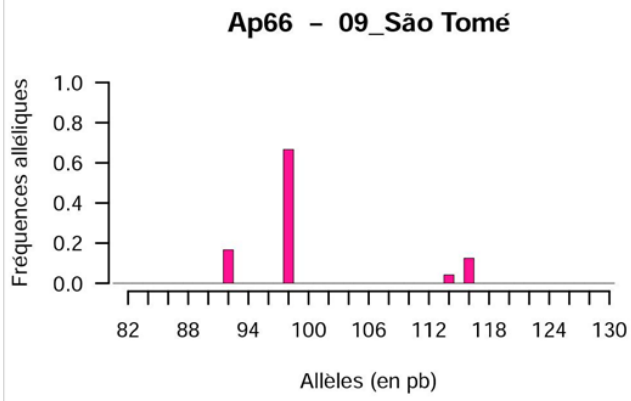

Ap66 – 04_Rodrigues
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
82 88 94 100 106 112 118 124 130
Allèles (en pb)

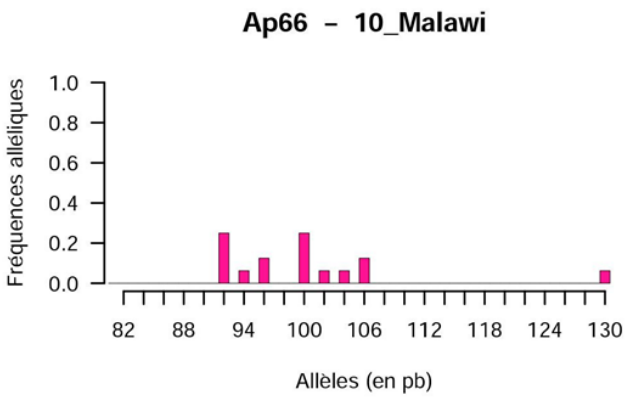

Ap66 – 05_Mahé
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
82 88 94 100 106 112 118 124 130
Allèles (en pb)

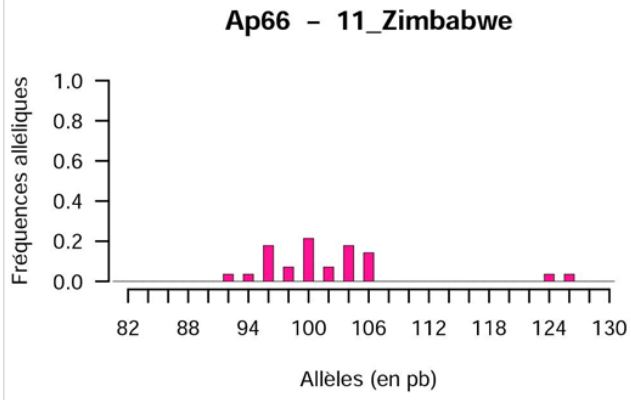

Ap66 – 06_Praslin
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
82 88 94 100 106 112 118 124 130
Allèles (en pb)

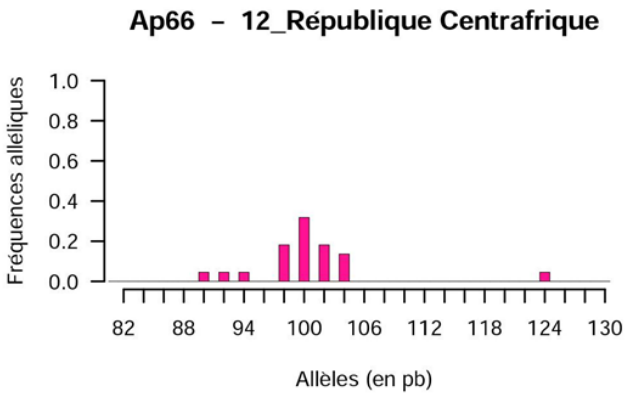

Ap66 – 07_La Digue
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
82 88 94 100 106 112 118 124 130
Allèles (en pb)

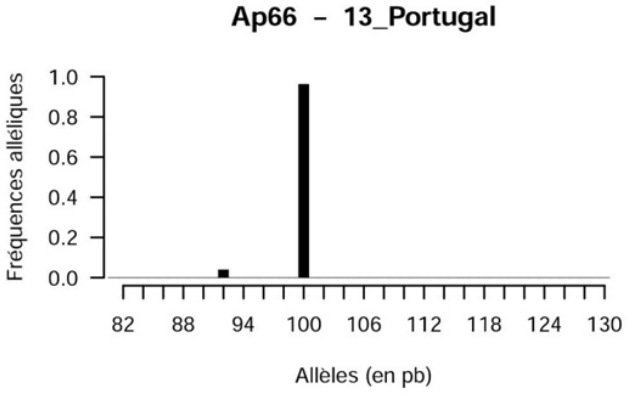

Ap66 – 08_Afrique du Sud
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
82 88 94 100 106 112 118 124 130
Allèles (en pb)

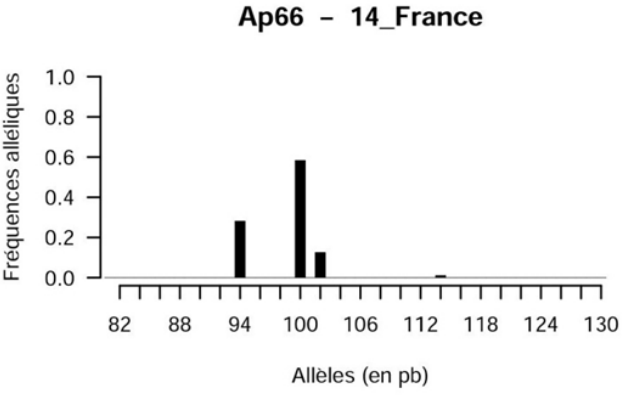

Ap66 – 09_São Tomé
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
82 88 94 100 106 112 118 124 130
Allèles (en pb)

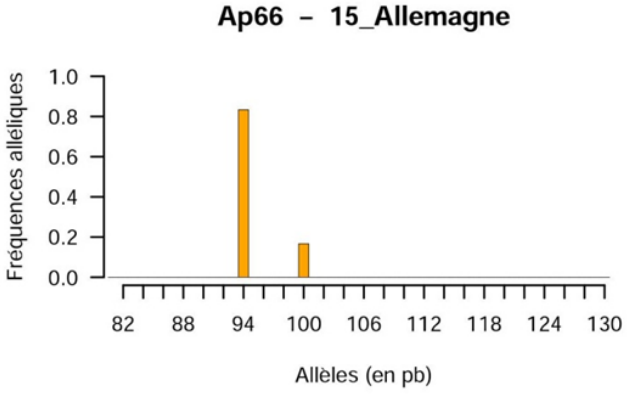

Ap66 – 10_Malawi
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
82 88 94 100 106 112 118 124 130
Allèles (en pb)

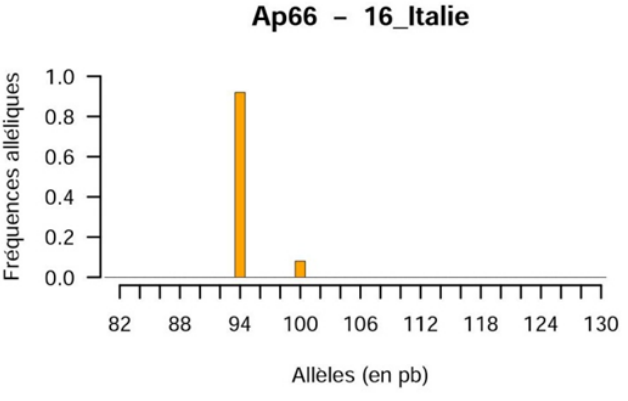

Ap66 – 11_Zimbabwe
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
82 88 94 100 106 112 118 124 130
Allèles (en pb)

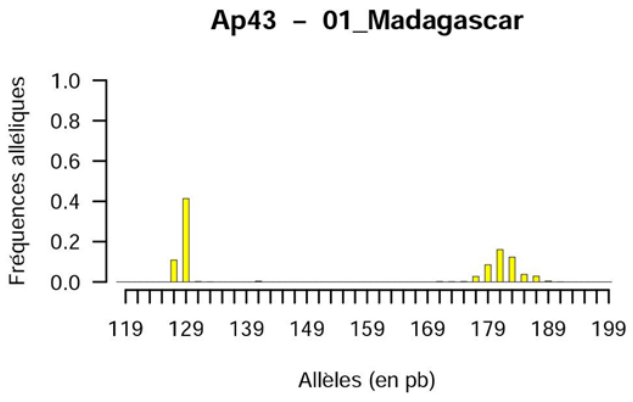

Ap66 – 12_République Centrafrique
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
82 88 94 100 106 112 118 124 130
Allèles (en pb)

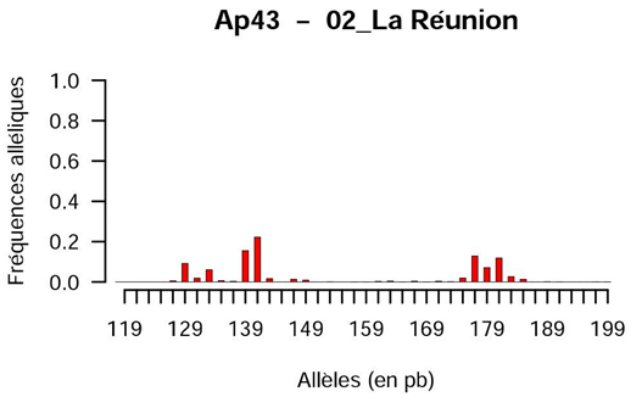

Ap66 – 13_Portugal
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
82 88 94 100 106 112 118 124 130
Allèles (en pb)

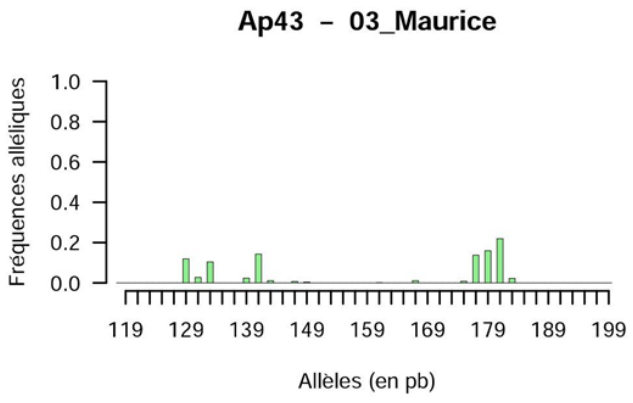

Ap66 – 14_France
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
82 88 94 100 106 112 118 124 130
Allèles (en pb)

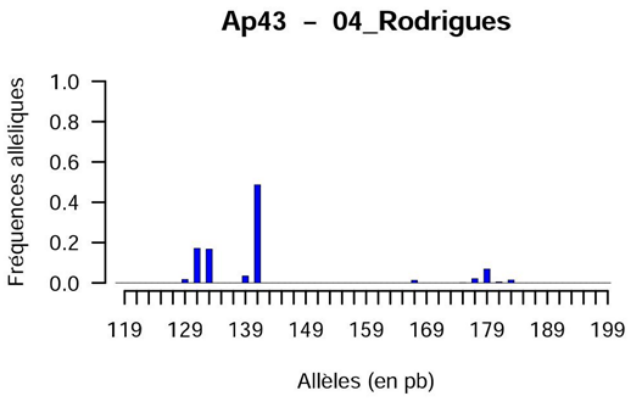

Ap66 – 15_Allemagne
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
82 88 94 100 106 112 118 124 130
Allèles (en pb)

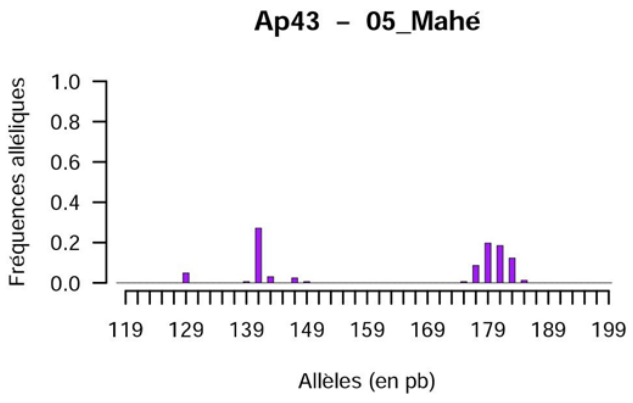

Ap66 – 16_Italie
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
82 88 94 100 106 112 118 124 130
Allèles (en pb)

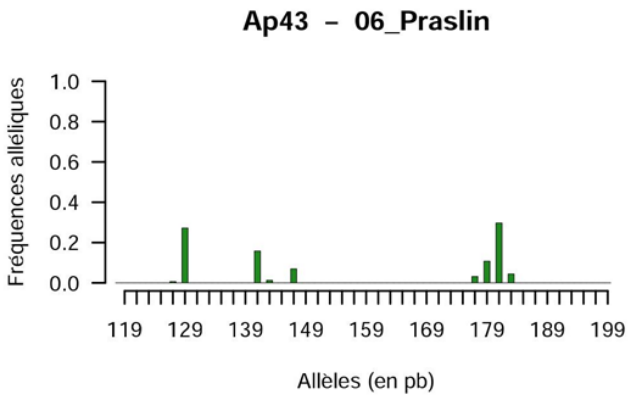

Ap43 – 01_Madagascar
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
119 129 139 149 159 169 179 189 199
Allèles (en pb)

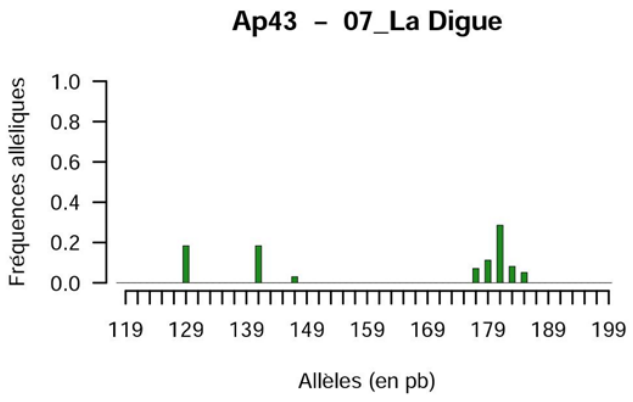

Ap43 – 02_La Réunion
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
119 129 139 149 159 169 179 189 199
Allèles (en pb)

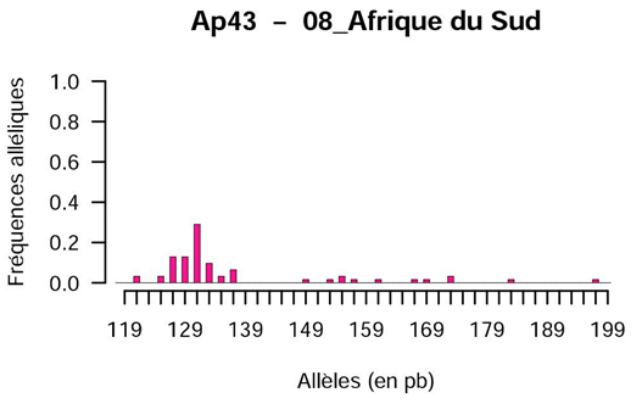

Ap43 – 03_Maurice
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
119 129 139 149 159 169 179 189 199
Allèles (en pb)

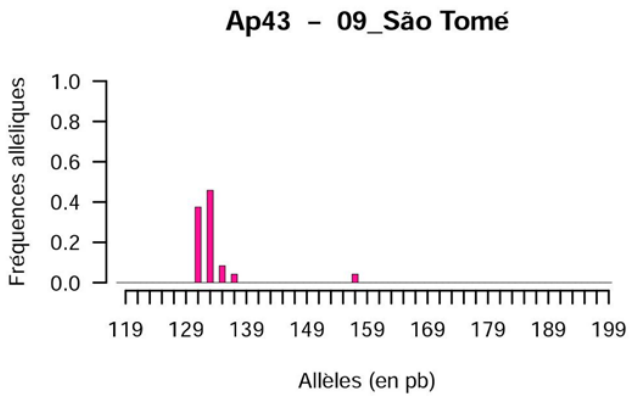

Ap43 – 04_Rodrigues
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
119 129 139 149 159 169 179 189 199
Allèles (en pb)

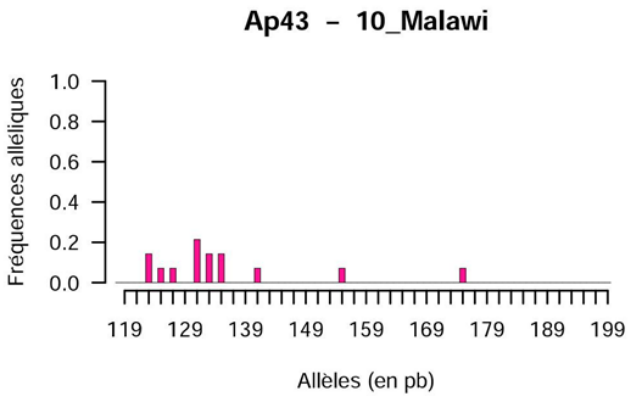

Ap43 – 05_Mahé
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
119 129 139 149 159 169 179 189 199
Allèles (en pb)

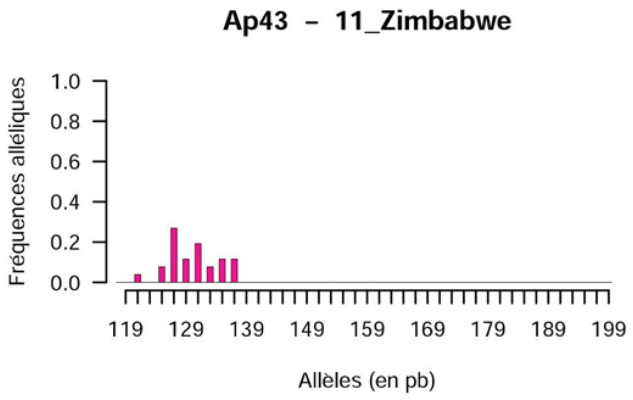

Ap43 – 06_Praslin
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
119 129 139 149 159 169 179 189 199
Allèles (en pb)

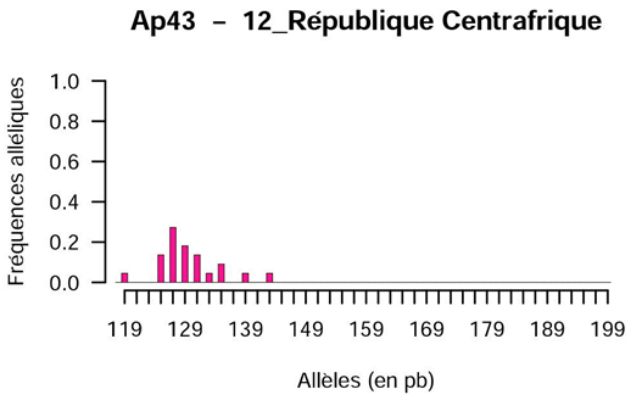

Ap43 – 07_La Digue
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
119 129 139 149 159 169 179 189 199
Allèles (en pb)

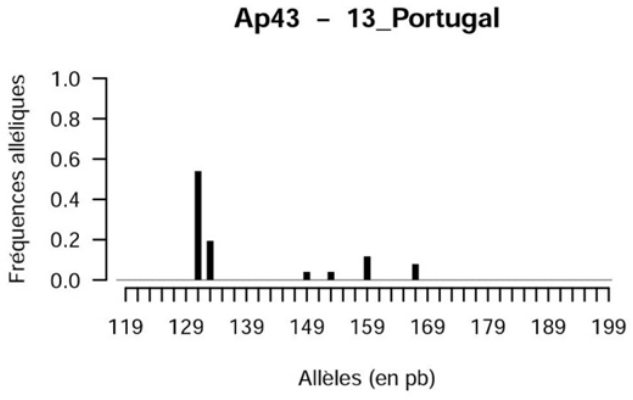

Ap43 – 08_Afrique du Sud
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
119 129 139 149 159 169 179 189 199
Allèles (en pb)

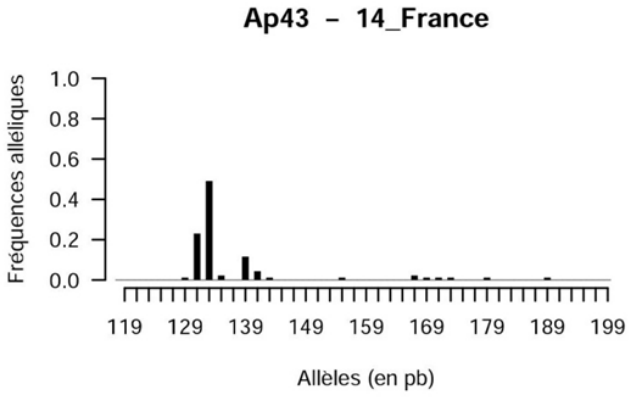

Ap43 – 09_São Tomé
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
119 129 139 149 159 169 179 189 199
Allèles (en pb)

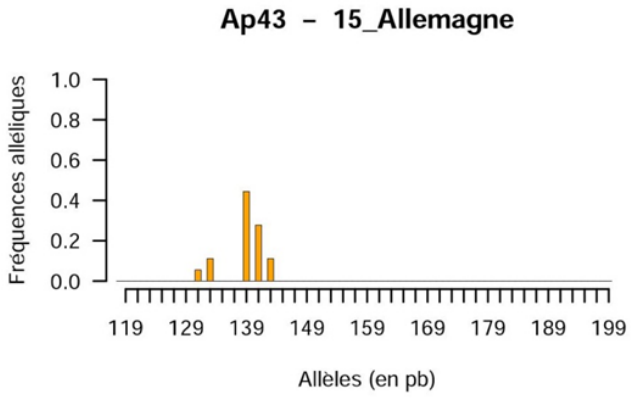

Ap43 – 10_Malawi
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
119 129 139 149 159 169 179 189 199
Allèles (en pb)

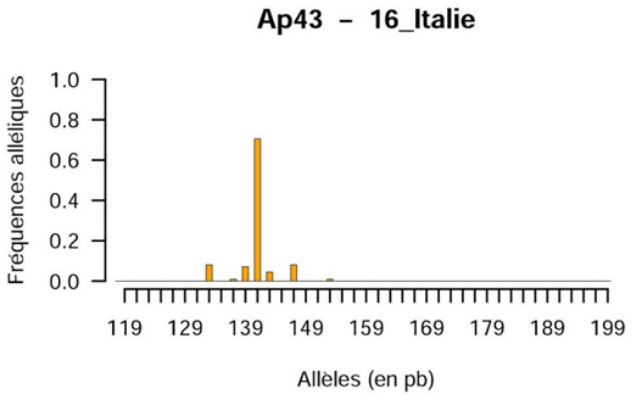

Ap43 – 11_Zimbabwe
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
119 129 139 149 159 169 179 189 199
Allèles (en pb)


Ap43 – 12_République Centrafrique
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
119 129 139 149 159 169 179 189 199
Allèles (en pb)


Ap43 – 13_Portugal
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
119 129 139 149 159 169 179 189 199
Allèles (en pb)


Ap43 – 14_France
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
119 129 139 149 159 169 179 189 199
Allèles (en pb)


Ap43 – 15_Allemagne
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
119 129 139 149 159 169 179 189 199
Allèles (en pb)


Ap43 – 16_Italie
Fréquences alléliques
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
119 129 139 149 159 169 179 189 199
Allèles (en pb)