

Développement et validation d'une nouvelle méthode d'analyse pour déterminer le degré d'hybridation des abeilles mellifères

Melanie Parejo, Agroscope, Centre de recherche apicole, 3003 Berne

Introduction : Lors d'une étude récemment publiée¹, à laquelle le Centre de recherche apicole d'Agroscope a participé, des scientifiques ont développé un nouveau test pour déterminer le degré d'hybridation des abeilles mellifères. Ce test est basé sur des nouveaux marqueurs génétiques qui montrent les différences maximales entre les groupes M et C. Il permet ainsi de déterminer très précisément le croisement entre les sous-espèces d'abeilles *mellifera* et *camica*. Ce test a été validé dans une étude scientifique portant sur 573 échantillons provenant de toute l'Europe, dont 87 de Suisse.

Le système d'accouplement complexe de l'abeille mellifère, dans lequel les jeunes reines s'accouplent avec plusieurs faux-bourçons sur des places de rassemblement de mâles parfois très éloignés de la ruche, rend difficile la préservation de races d'abeilles mellifères pures et la sélection contrôlée. Si différentes sous-espèces d'abeilles sont élevées dans la même zone, l'hybridation peut difficilement être contrée. Par conséquent, le contrôle constant de la filiation des abeilles dans un programme d'élevage ou une zone protégée est inévitable.

Les hybrides sont identifiés par des méthodes classiques au moyen de caractéristiques morphologiques. On se sert souvent à cet effet de l'innervation alaire, typique de la race et qui se transmet de génération en génération. Aujourd'hui, on effectue également des analyses d'ADN basées sur des microsatellites. Les microsatellites sont de courtes séquences d'ADN qui souvent se répètent dans le génome d'un organisme et qui sont traditionnellement utilisées en génétique des populations. En raison des progrès continus dans la technologie de séquençage et de génotypage, des tests ADN basés sur les SNP sont également développés. Les SNP (abréviation anglaise pour « single nucleotide polymorphisms » polymorphismes nucléotidiques simples) indiquent des variations ponctuelles dans le code génétique des organismes vivants. L'utilisation des SNP comme marqueurs génétiques présente donc de nombreux avantages. D'une part, les SNP se rencontrent fréquemment dans le génome et permettent un génotypage avec un faible taux d'erreur. D'autre part, les données SNP de haute qualité peuvent être facilement transférées d'un laboratoire à l'autre. Chez d'autres espèces d'animaux de rente, le génotypage SNP à l'aide de puces SNP a déjà été appliqué avec succès dans les programmes d'élevage.

Développement d'un test SNP

Un test SNP pour différencier avec précision les groupes M et C a été récemment mis au point et validé^{1,2} par le groupe de recherche dirigé par la professeur A. Pinto (Portugal). Pour cette étude, le Centre de recherche apicole d'Agroscope a fourni 87 échantillons et contribué à l'évaluation des données. Le test a commencé par un ensemble de données constitué de

1536 SNP et de 113 abeilles (*carnica*, *ligustica*, *mellifera*), qui auparavant avaient été classées par morphométrie ou analyse microsatellite. Les SNP ont été classés sur la base de diverses méthodes statistiques (Weir & Cockerham's F_{ST} , F_{ST} -outlier test, Delta, informativeness (In), PCA) en fonction de leur contenu d'informations pour procéder à la différenciation entre les groupes M et C. Par la suite, les 144 SNP les plus informatifs – qui permettent au mieux de distinguer les abeilles M des abeilles C – ont été sélectionnés. Les régions génomiques supportant ces 144 SNP ont ensuite été utilisées pour concevoir des sondes d'essai et procéder au génotypage des SNP sur la plate-forme MassARRAY® MALDI-TOF d'Agena Biosciences. Parmi les 144 SNP informatifs d'origine, des sondes d'essai ont été conçues avec succès pour 127 SNP. Dix autres SNP ont échoué au contrôle de qualité, car ils présentaient des bases incohérentes ou un faible taux de génotypage. Au final, il restait 117 marqueurs génétiques de bonne qualité et hautement informatifs. Les SNP sont uniformément localisés sur tous les chromosomes de l'abeille mellifère (figure 1) et couvrent ainsi tout le génome.

Validation du test SNP

Pour valider le test d'hybridation SNP conçu, 573 échantillons provenant de toute l'Europe ont été génotypés et testés. L'ensemble de données utilisé pour ces calculs se composait de faux-bourçons, d'ouvrières et d'échantillons mélangés de bourçons de différentes races (*mellifera*, *carnica*, *ligustica*, Buckfast et leurs hybrides).

Dans une première analyse, les résultats du nouveau test constitué de 117 SNP ont été comparés aux résultats du séquençage complet (2,399 millions de SNP). Comme on peut le voir sur la figure 2, l'ensemble du génome, qui fournit les informations les plus précises sur l'ascendance, corrèle fortement avec l'information des 117 SNPs. En outre, l'écart moyen par rapport au degré d'hybridation, calculé sur la base du génome complet, est très faible (2 %). L'hybridation calculée avec 117 SNP est donc très proche de l'hybridation effective. L'écart maximal était toutefois relativement élevé (11,4 %).

Dans une seconde analyse, 16 reines *mellifera* ont été croisées avec des faux-bourçons *carnica* et leurs descendants ont été testés avec les 117 SNP. Le degré d'hybridation attendu pour un croisement avec des parents d'origine pure est d'environ 0,5, et en effet, le degré d'hybridation des 16 ouvrières testées était très proche de cette valeur ($0,56 \pm 0,03$).

Par ailleurs, la sensibilité pour détecter les degrés d'hybridation les plus faibles a aussi été étudiée. Pour cette analyse, des échantillons d'ADN de deux faux-bourçons haploïdes (un *ligustica* et un *mellifera*) avec des rapports différents ont été mélangés : 10:20, 5:20, 2:20, 1:20 et 0.5:20. Les allèles de *ligustica* ont pu être détectés avec fiabilité à chaque répétition jusqu'à un rapport de 2:20. Dans le cas de dilutions encore plus faibles, 29 des 177 SNP pouvaient détecter les deux allèles, mais à ce stade la détermination du degré d'hybridation est de plus en plus imprécise.

Conclusions

Aujourd'hui, dans l'apiculture moderne, il est nécessaire de s'appuyer sur des outils moléculaires capables de déterminer avec précision et sans trop de frais les différents degrés

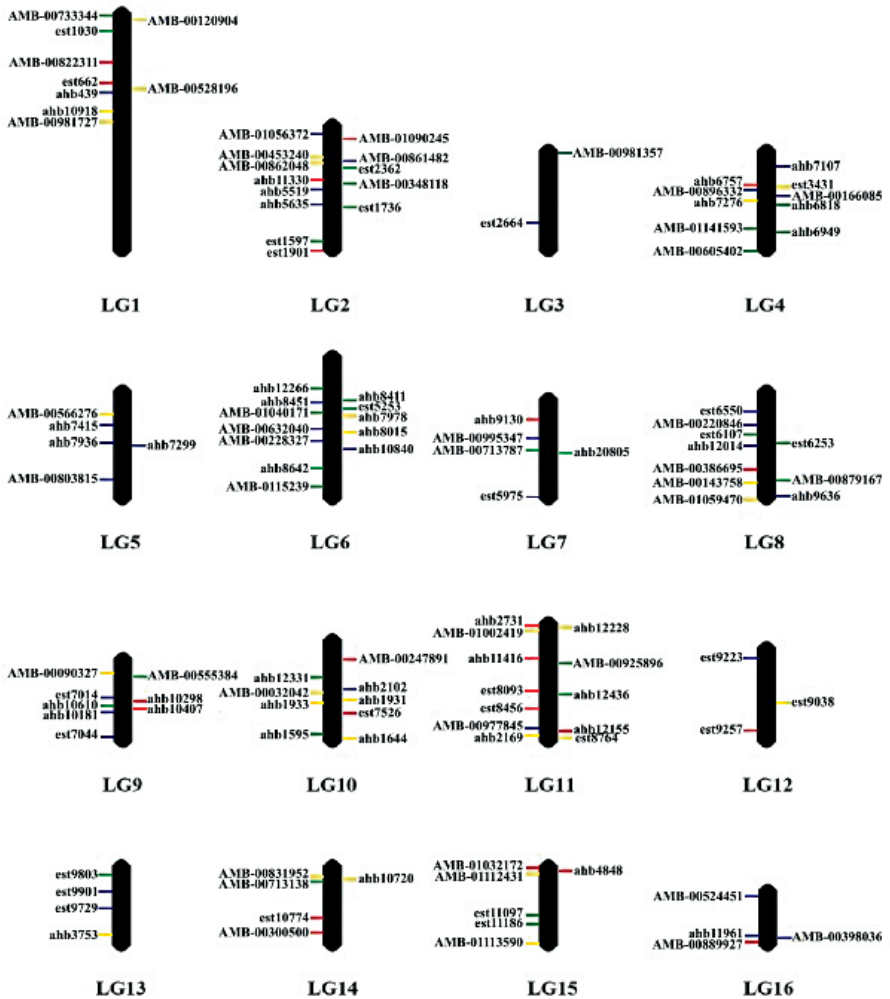


Figure 1. Positions des 117 SNP du nouveau test d'hybridation sur les 16 chromosomes de l'abeille mellifère.

d'hybridation. Dans l'ensemble, le nouveau test SNP a obtenu de très bons résultats dans toutes les analyses. Toutefois, des écarts sont possibles dans certains cas, malgré les technologies et les méthodes d'évaluation les plus modernes. Comme la variation naturelle est très importante, il peut arriver que toutes les variantes n'aient pas été prises en compte. Dans les cas incertains, il est donc important d'examiner d'autres caractéristiques de la colonie lors de l'interprétation des résultats. Pour terminer, précisons encore qu'il serait dommage de remplacer des abeilles de race pure mais présentant une multiplicité de caractères car les abeilles ont besoin d'une diversité génétique³ suffisante pour être en bonne forme physique.

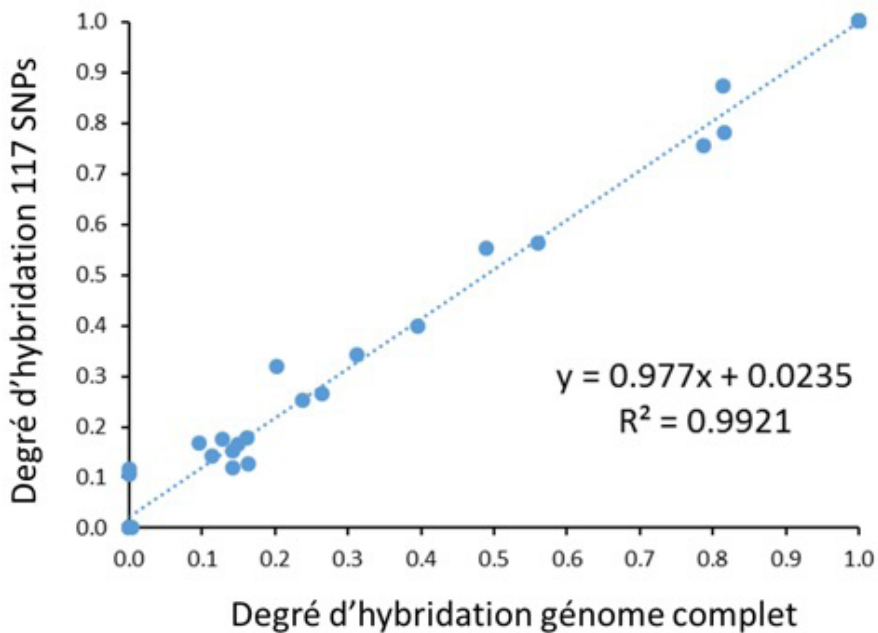


Figure 2. Les valeurs d'hybridation calculées au moyen du nouveau test SNP corrént très fortement avec les valeurs obtenues par le biais du séquençage génomique complet.

Box 1 : Possibilités pour déterminer la race

La première classification systématique des sous-espèces d'abeilles est basée sur la description et la mesure de caractéristiques morphologiques montrant des différences visibles. On utilise en particulier les caractéristiques héréditaires des ailes. Cependant, les données sur les abeilles africanisées⁴ montrent que la morphométrie des ailes ne convient pas pour

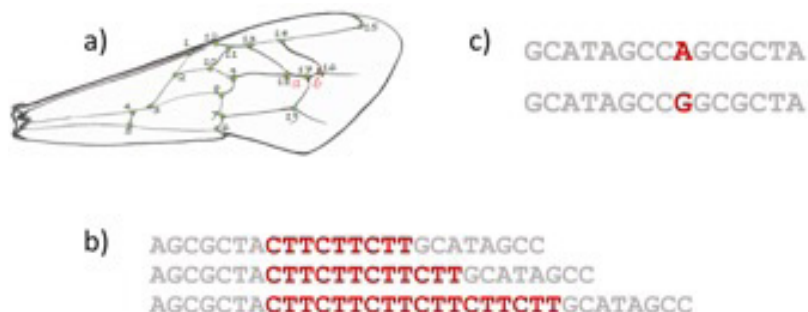


Figure 3. La morphologie des ailes (a) de même que les microsatellites (b) et les SNP (c) peuvent être utilisés pour déterminer la race.

détecter de faibles degrés d'hybridation. On recourt donc à des marqueurs génétiques tels que les microsatellites pour remédier à cette restriction d'usage. En effet, les microsatellites ont apporté une contribution importante à l'analyse de la génétique des populations d'abeilles. Leur introduction dans les programmes d'élevage a représenté un nouveau progrès. Entre-temps, de nouveaux tests génétiques basés sur les SNP ont été mis au point et il a été démontré qu'un petit nombre de SNP très informatifs surpassent les microsatellites pour ce qui est de l'exactitude des estimations d'hybridation^{4,5}.

Toutes les méthodes comprennent des avantages et des inconvénients. Outre la prise en compte des coûts et des contraintes, le choix d'un test génétique adapté dépend avant tout de l'application et de la problématique. A noter que les mesures morphologiques peuvent être complétées de manière optimale par des analyses de marqueurs génétiques.

Bibliographie

1. Henriques D, Browne K, Kryger P, Muñoz I, Parejo M, Barnett M, McCormack G, Garnery L & Pinto MA (2018). High sample throughput genotyping for estimating C-lineage introgression in the dark honeybee: an accurate and cost-effective SNP-based tool. *Scientific Reports*.
2. 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 (*Apis mellifera mellifera*). PLoS ONE.
3. Guzmán-Novoa E, Page RE & Fondrk MK (1994). Morphometric techniques do not detect intermediate and low levels of Africanization in honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies. *Annals of the Entomological Society of America*.
4. Muñoz I, Henriques D, Jara L, Johnston JS, Chávez-Galarza J, De La Rúa P & Pinto MA (2016). SNPs selected by information content outperform randomly selected microsatellite loci for delineating genetic identification and introgression in the endangered dark European honeybee (*Apis mellifera mellifera*). *Molecular Ecology Resources*.
5. Parejo M, Henriques D, Soland-Reckeweg G, Pinto MA & Neuditschko M (2018). Empirical comparison of microsatellite and SNP markers to estimate introgression in *Apis mellifera mellifera*. *Journal of Apicultural Research*.

Le test d'hybridation SNP est également disponible en Suisse

Le nouveau test d'hybridation est bientôt disponible en Suisse.

Vous trouverez davantage d'informations sur : www.mp-genetics.com

Contact : D^r Mélanie Parejo, mp-genetics@outlook.com, +41 33 533 33 53

mpgenetics