

L'abeille *Apis mellifera* dans le zone Océan Indien

Quelle(s) sous-espèce(s)? Objectif 1
Etat sanitaire de l'abeille ? Objectif 2-3-4
Ecologie de l'abeille ? Objectif 5



Quelle(s) sous-espèce dans le zone OI ?

Objectif 1 : caractériser la diversité génétique mitochondriale



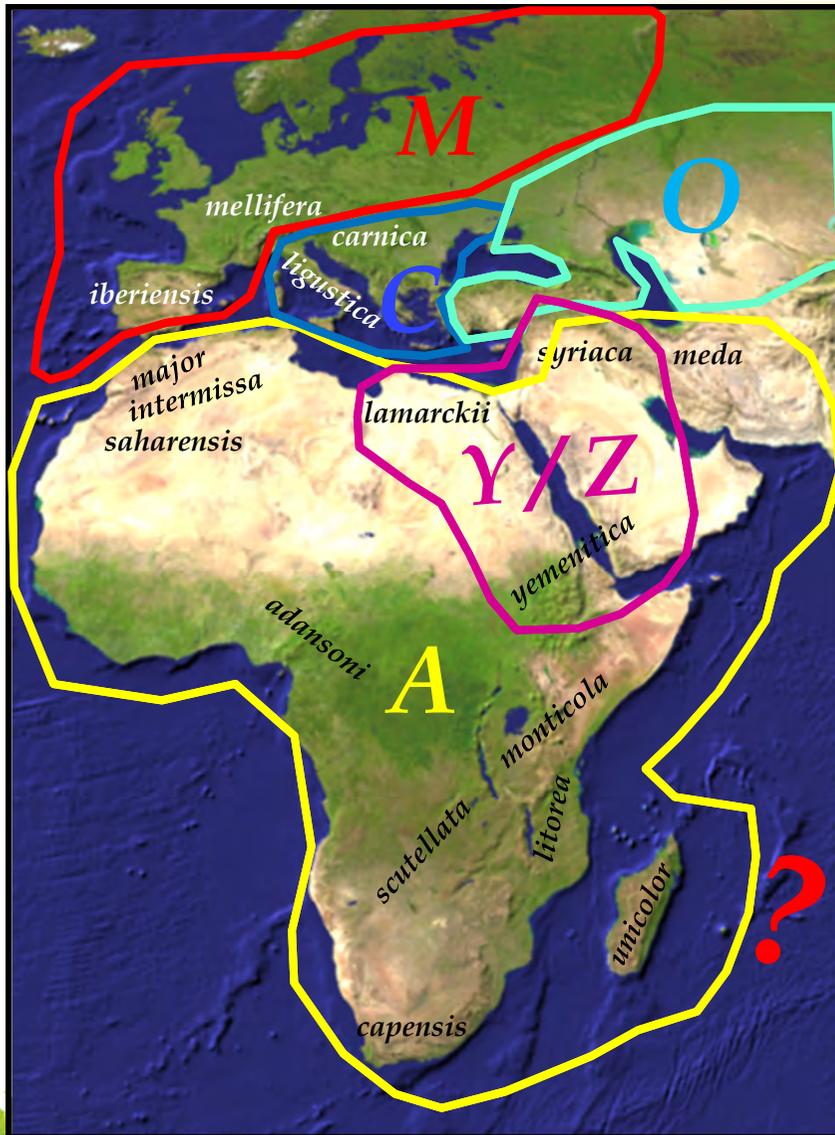
Thèses :
Henriette Rasolofoarivao
Co-tutelle Université d'Antananarivo / Cirad
L. Raveloson – B. Reynaud
Co-Encadrement : Delatte / Clémencet



Maéva Técher
Université de la Réunion/ Cirad
B. Reynaud
Co-Encadrement : Delatte / Clémencet

Partenaires :
Madagascar Université d'Antananarivo,
Associations des apiculteurs
Mayotte Inrape
Maurice Ministry of Agroindustry and
Food Security
Rodrigues Agricultural
Service/Rodrigues Regional Assembly
Seychelles Seychelles Agricultural
Agency

La diversité génétique de l'abeille *Apis mellifera* dans le monde



- *A. mellifera* est **endémique** d'Afrique et d'Europe
(Whitfield *et al.* 2006; Han *et al.* 2012)

- **5 lignées évolutives** (Ruttner 1988, Garnery *et al.* 1998)

- Au sein de l'espèce, **29 sous-espèces** (races) décrites

→ ≠ morphologie, génétique, comportement,...



- **Sud-Ouest de l'Océan Indien?** *A priori* lignée A
mais introductions multiples sur plusieurs îles



***Etudier la diversité génétique de l'abeille dans le Sud-Ouest de l'O.I.
Co-financements : CIOM APITROP, Région Réunion, CIRAD***



1) Quelles sont les **lignées évolutives maternelles** présentes sur les populations insulaires du SWIO?

2) Quelles sont les **sous-espèces** détectées?

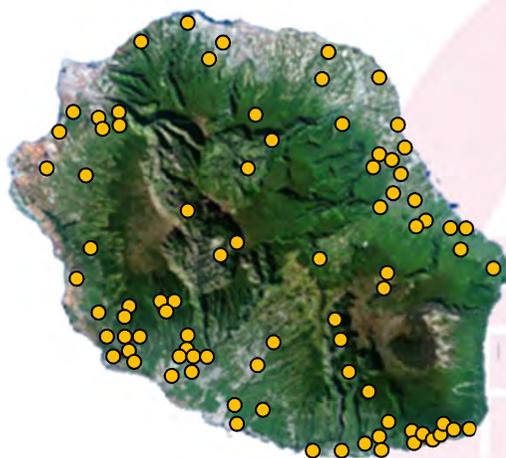
MARQUEUR MITOCHONDRIAL Garnery et al. (1993)

Région intergénique COI – COII (Dra I + Séquençage)

- Etude de la diversité génétique mitochondriale au travers des **haplotypes** détectés
- Comparaison et blast des \neq haplotypes sur GENBANK

Echantillonnage des colonies d'abeilles sur les différentes îles

La Réunion



2075 colonies d'abeilles

68 Apiculteurs

● 106 sites

Maurice



355 colonies d'abeilles

14 Apiculteurs + Gvt

● 25 sites

Rodrigues



524 colonies d'abeilles

15 Apiculteurs + Gvt

● 20 sites

Echantillonnage des colonies d'abeilles sur les différentes îles

Les Seychelles



186 colonies d'abeilles
15 Apiculteurs + 11 sauvages

● 29 sites

Grande Comores

30 abeilles
10 sites



Mayotte

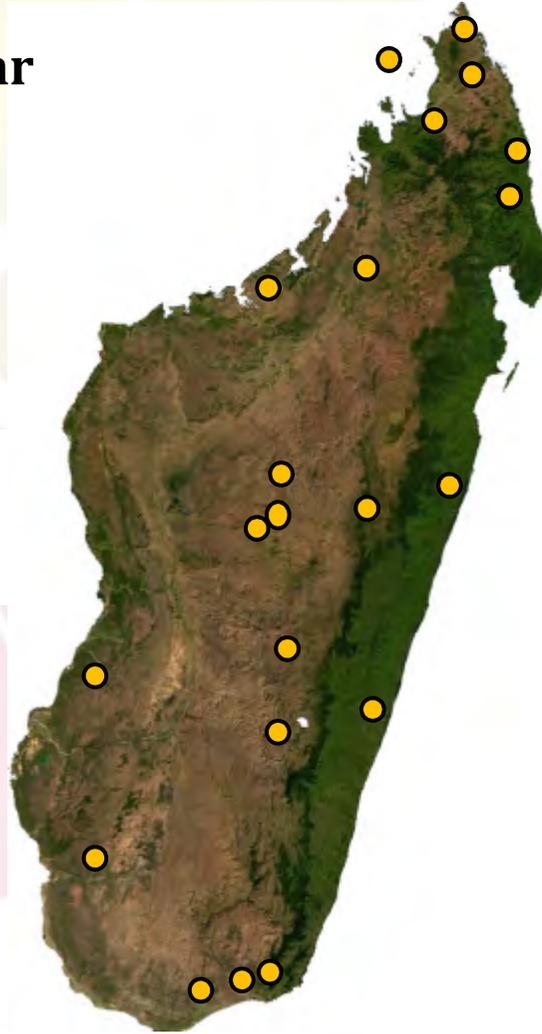
10 colonies

Echantillonnage des colonies d'abeilles sur les différentes îles

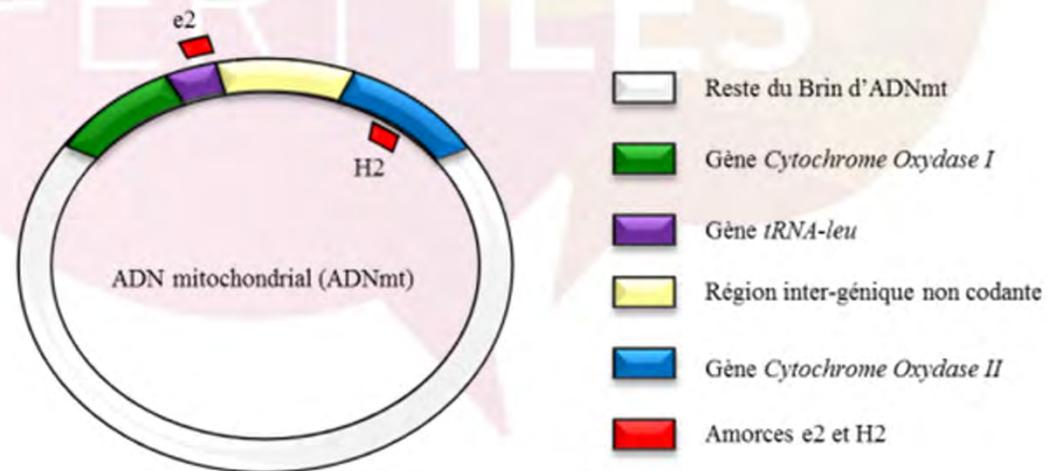
Madagascar

816 colonies d'abeilles

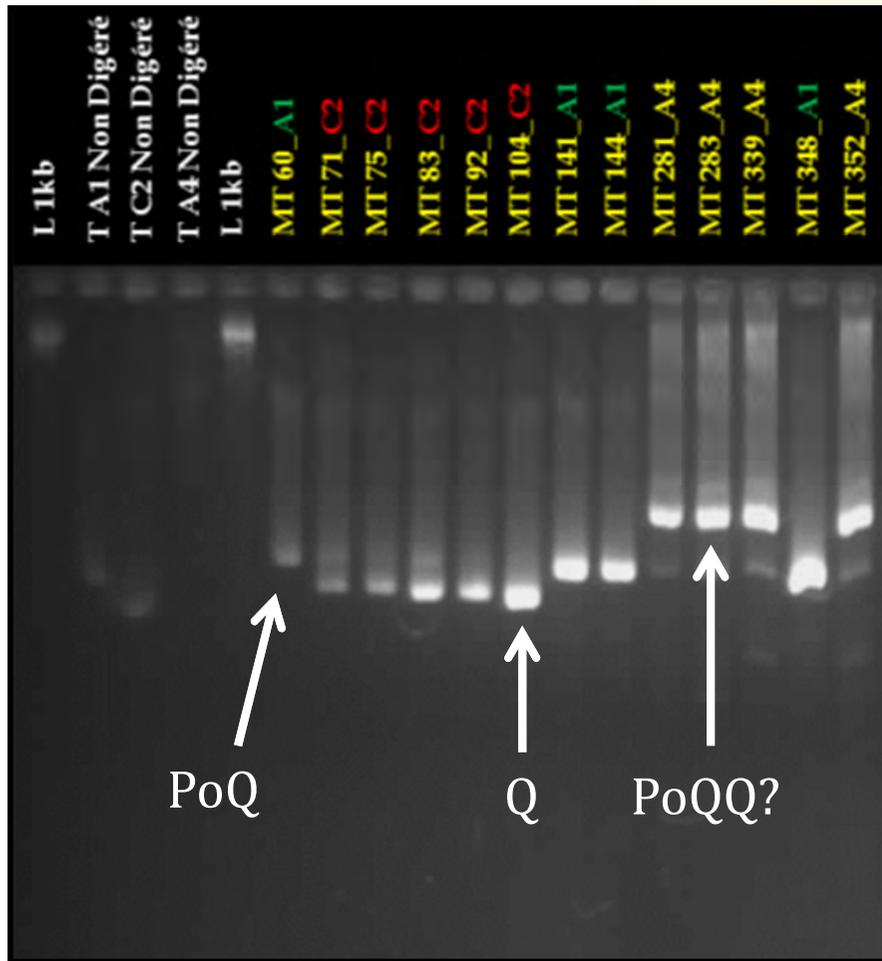
● 47 sites



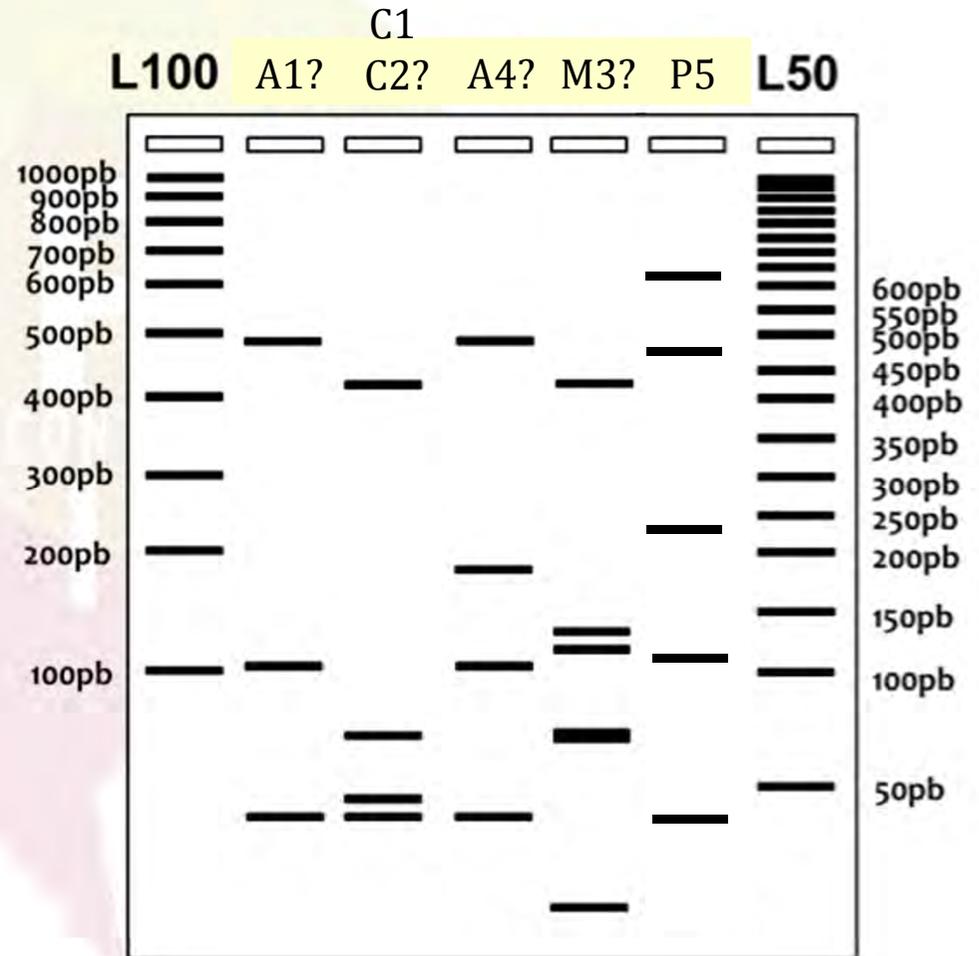
Résultats



Résultats de la détection des ≠ haplotypes avec le test *Dra* I (PCR-RFLP):

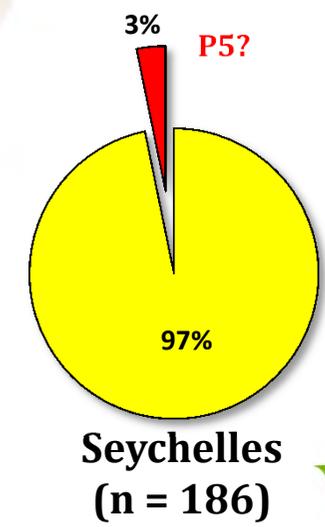
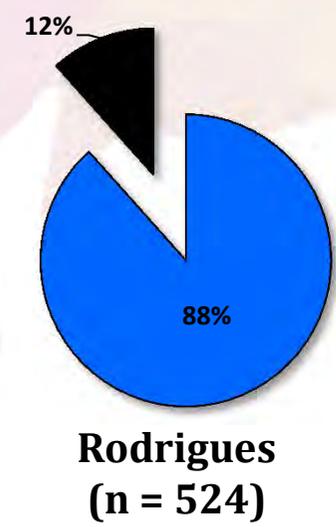
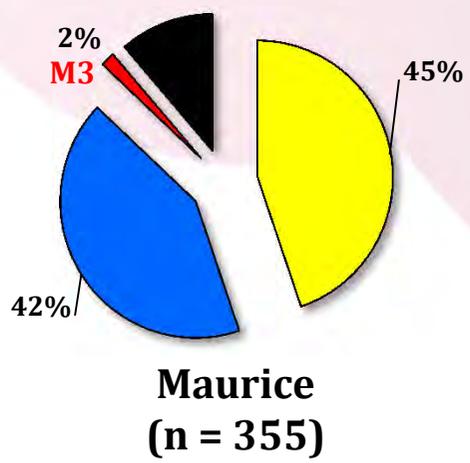
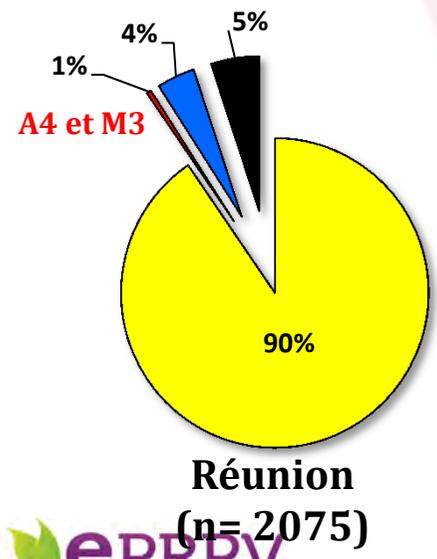
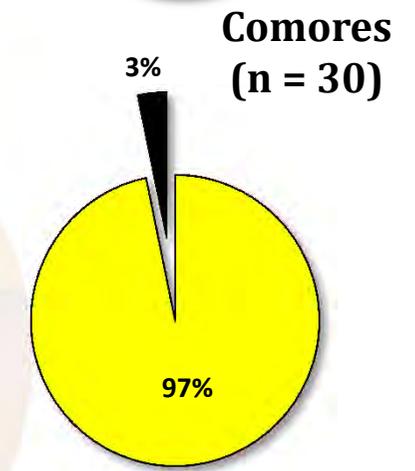
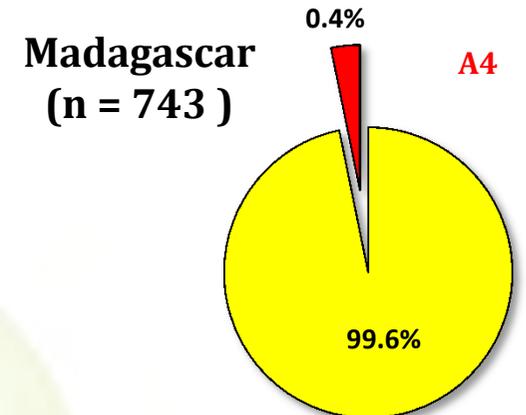
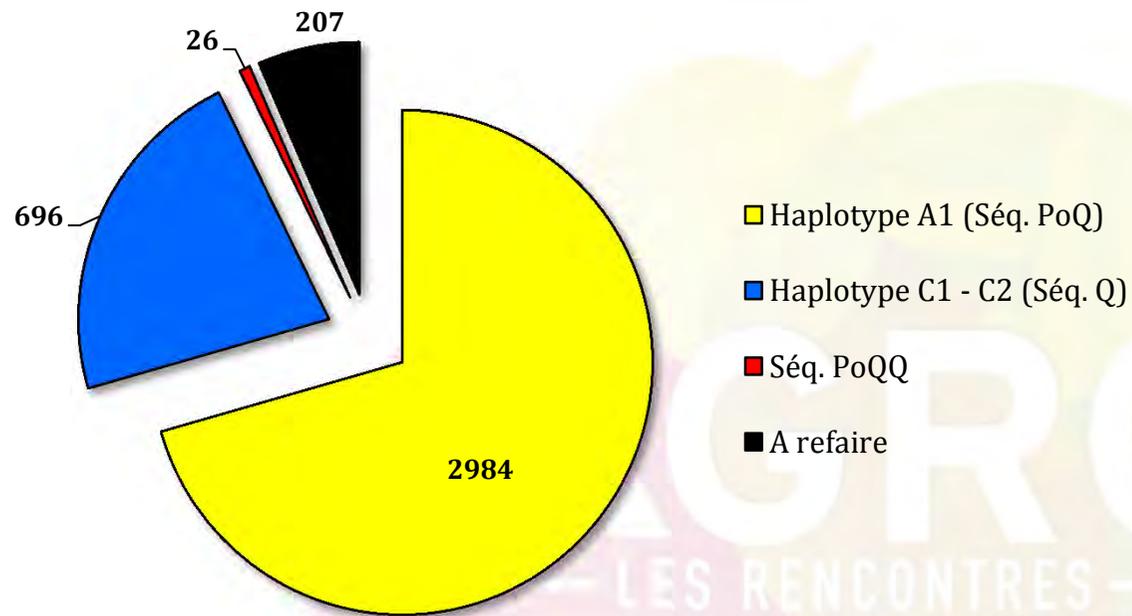


- 3 tailles de séquences COI-COII détectées entre 500 et 800 pb



- 5 types de profils de restrictions *Dra* I détectés

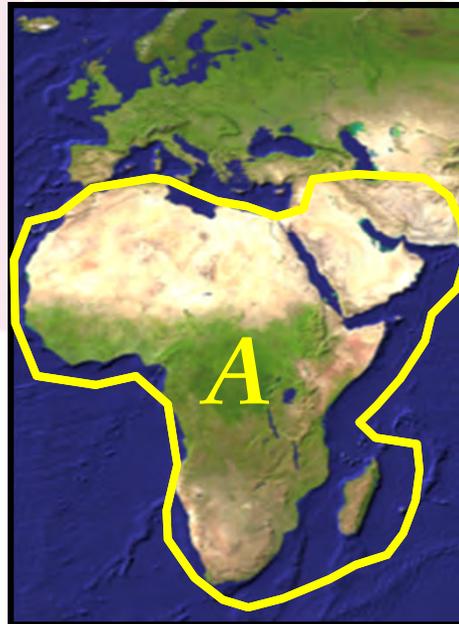
Répartition des haplotypes



Résultats des séquençages de la région intergénique COI-COII

Séquences de type PoQ → Haplotype A1

Lignée Africaine



Résultats des séquençages

	N _{seq.}	A1_a	A1_b	A1_c	A1_d	A1_e	A1_f	A1_g	A1_h	A1_i	A1_j	A1_k	A1_l
La Réunion	161	84	1										
Maurice	188	100		1	1								
Rodrigues	278												
Seychelles	89	86								3			
Comores	29	15					3	4	7				
Centrafrique	5					4							
Madagascar	48	44							1		1	1	1
	798	329	1	1	1	4	3	4	8	3	1	1	1

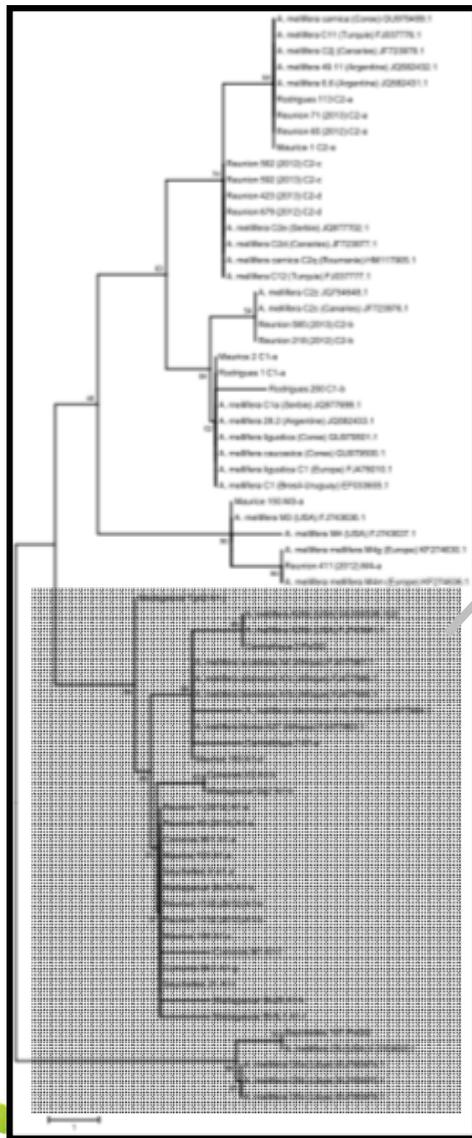
- 12 haplotypes ≠ pour le même profil de restriction A1 (mutations non ambiguës)

➔ Aucun n'est référencé dans la base GENBANK (Blast identité 99% A1)

- A1_a unicolor (Madagascar) présent à La Réunion, Maurice, Seychelles et Comores

- Toutes les îles et pays présentant le profil A1 ont au moins un haplotype privé

Résultats du Blast des séquences // données mondiale (GENBANK)



+ proche des A1 des sous-espèces africaines
(*A. m. litorea, intermissa*)

8 haplotypes très proches de A1_a
Apis mellifera unicolor

Résultats des séquençages de la région intergénique COI-COII

Séquences de type Q → Haplotype C1/C2

Lignée Européenne C

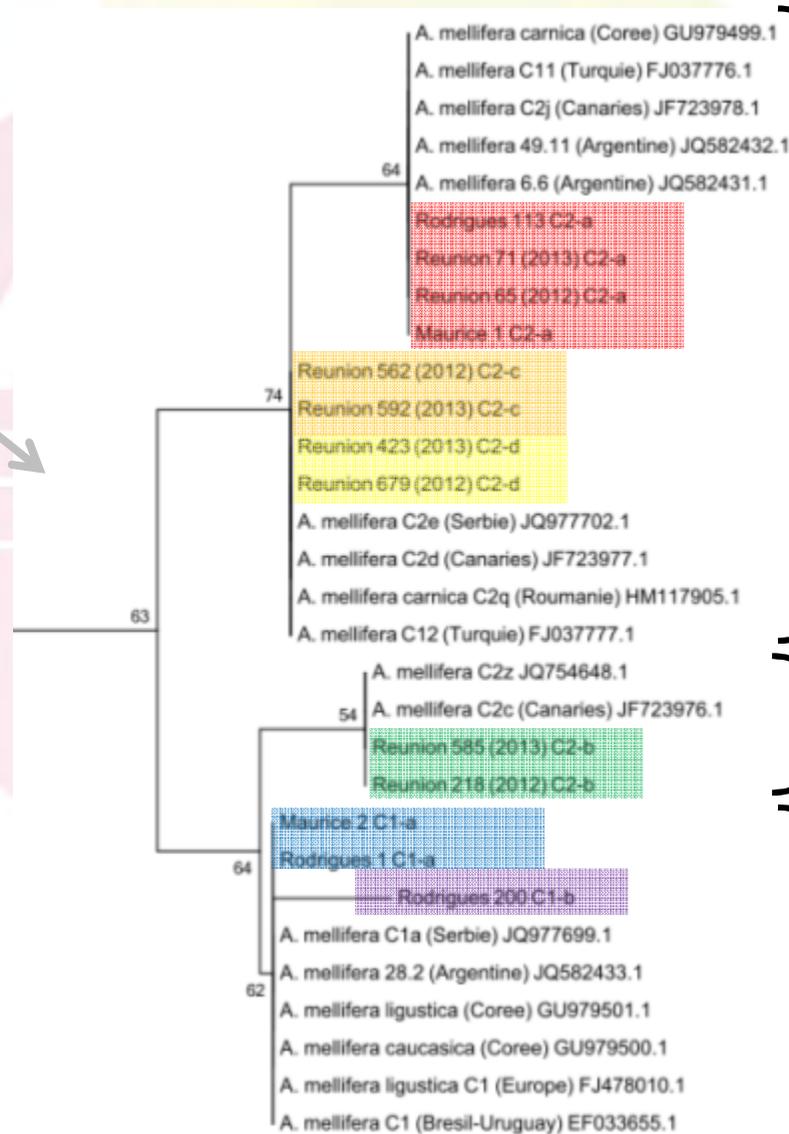
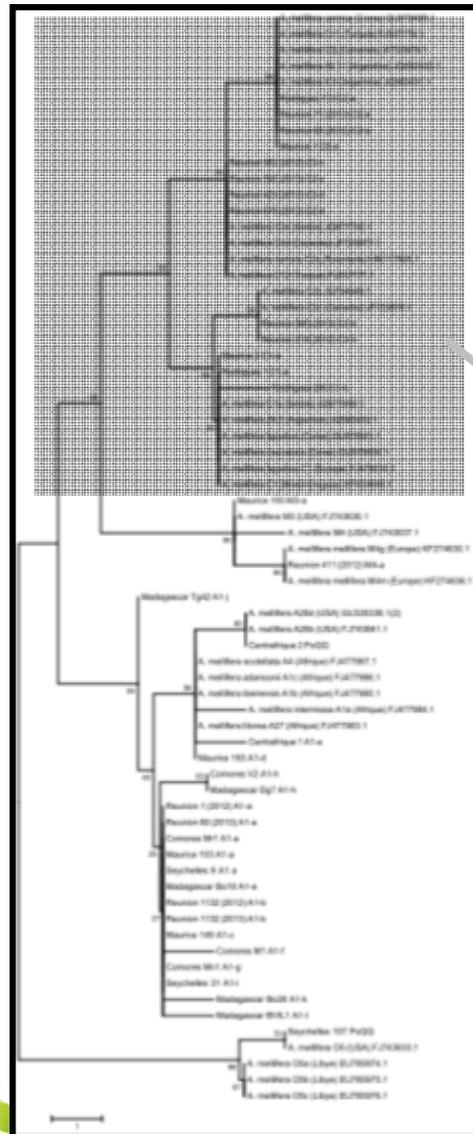


Résultats des séquençages

	N _{seq.}	C1_a	C1_b	C2_a	C2_b	C2_c	C2_d
La Réunion	161			30	8	23	14
Maurice	188	17		65			
Rodrigues	278	226	2	50			
Seychelles	89						
Comores	29						
Centrafrique	5						
Madagascar Henriette 2013	48						
	798	243	2	145	8	23	14

- Présence de la **lignée C** uniquement à Maurice, Rodrigues et La Réunion
- **6 haplotypes** ≠ pour le même profil de restriction C1/C2 (mutations non ambiguës)
- Seule C1_b non identifié à plus de 99% pour 100% (Query Cover) dans Genbank

Résultats du Blast des séquences // données mondiale (GENBANK)



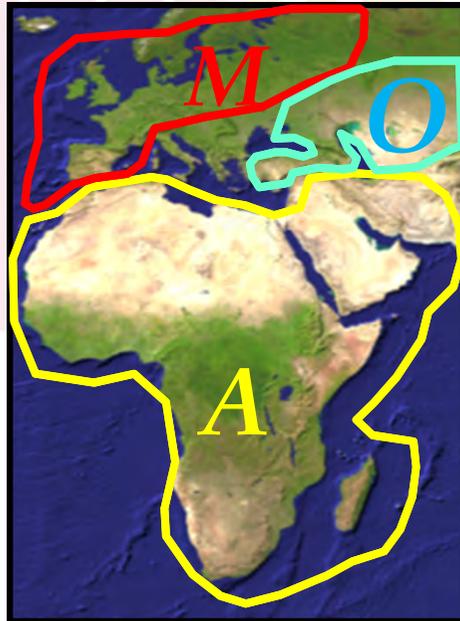
C2_a, c et d 100%
identiques à des
séquences *A. m. carnica*

A. m. carnica très
proche d'*A. m. ligustica*

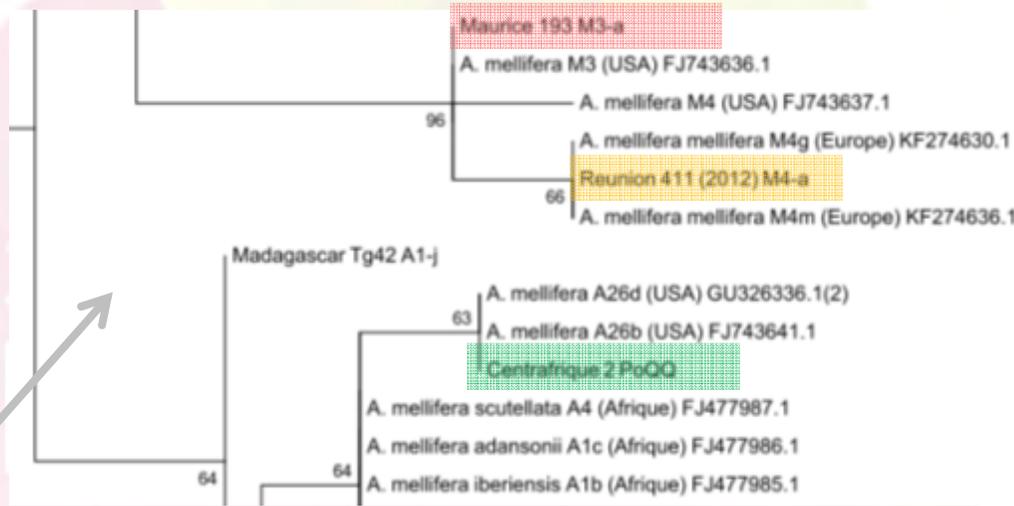
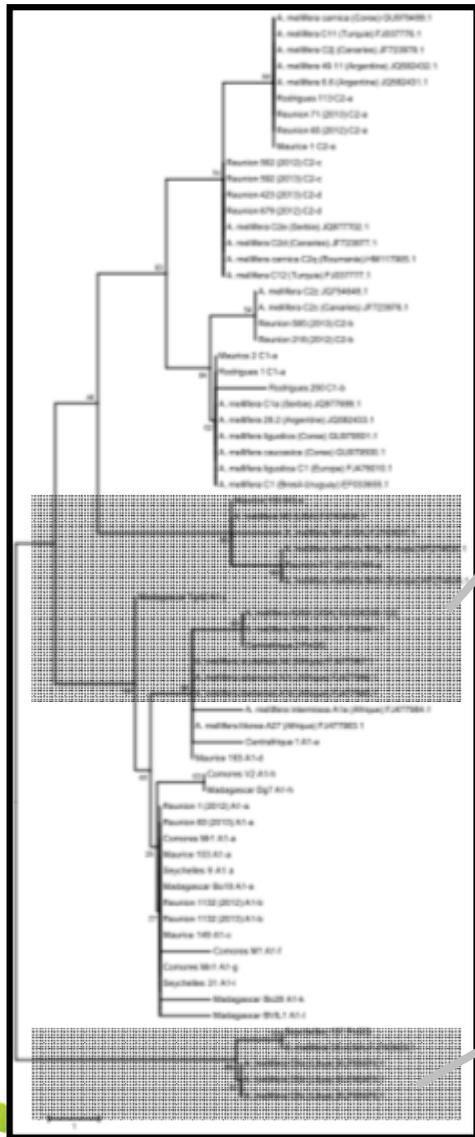
C1_a 100% et C1_b 99%
identiques à des
séquences *A. m. ligustica*

Résultats des séquençages de la région intergénique COI-COII

Séquences de type PoQQ



Résultats préliminaires sur les séquences



99% à M3

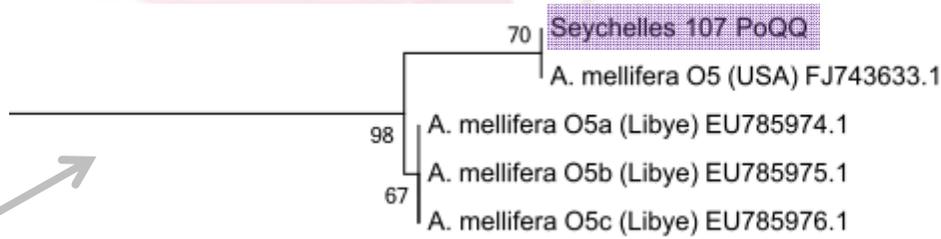
A. m. mellifera

100% à M4m

A. m. mellifera

99% à A4

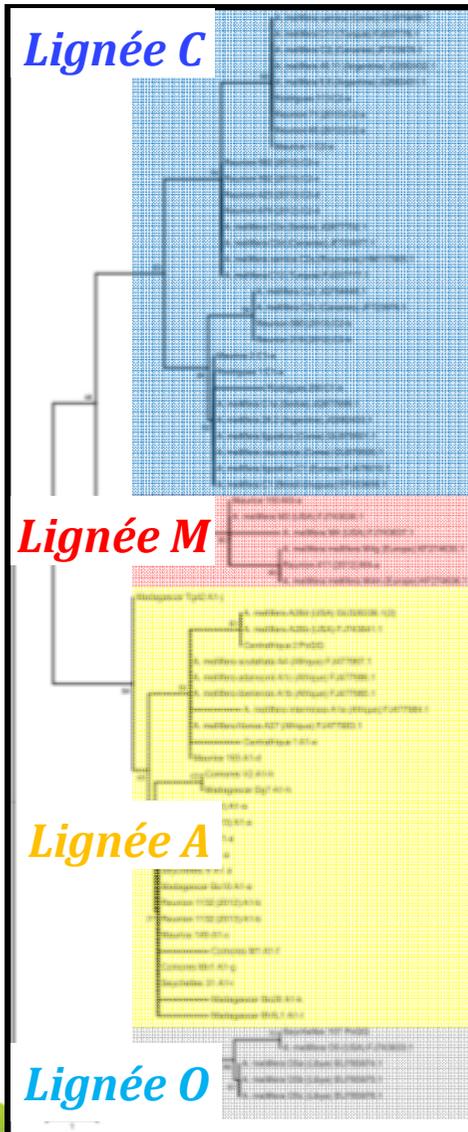
A. m. scutellata



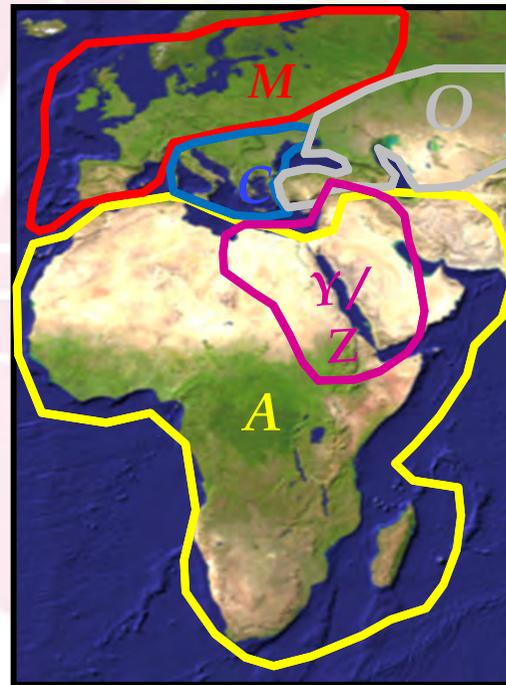
99% (99%)

Lignée 0

Résumé de la diversité génétique ADN mitochondrial:



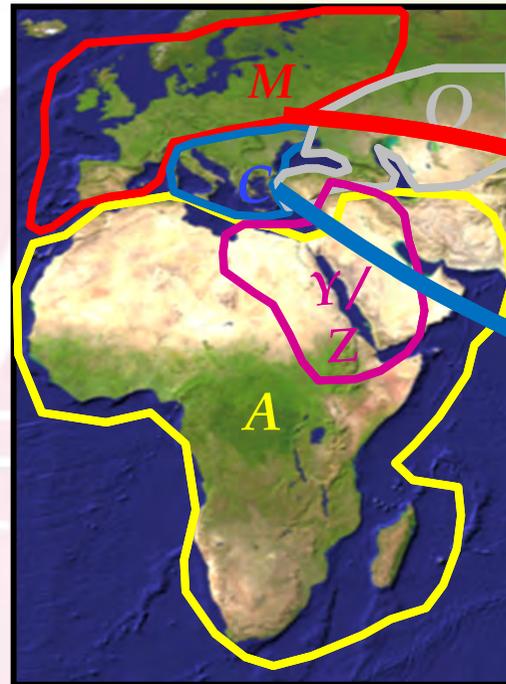
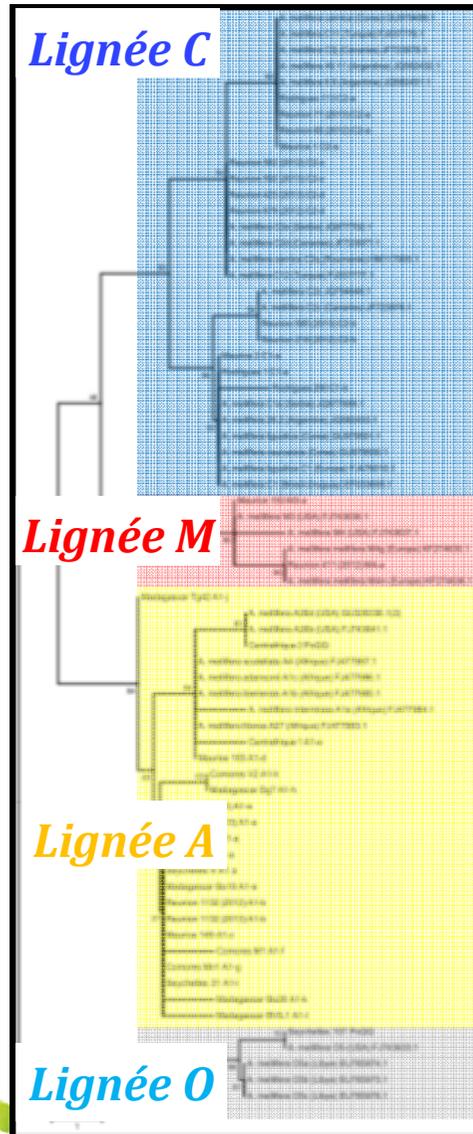
- Au moins 3 lignées sont présentes dans la Sud-Ouest de l'O.I.



- **Lignée A** présente et majoritaire dans la zone (excepté Rodrigues)

➔ 8 haplotypes A1 indicateurs d' *A. m. unicolor*

Résumé de la diversité génétique ADN mitochondrial:



- **Lignée C** présente dans l'archipel des Mascareignes
→ *A. m. carnica* sur les 3 et *A. m. ligustica* à Maurice et Rodrigues
- **Lignée M** présente à La Réunion et à Maurice
→ *A. m. mellifera* (Garnery et al. 2013)

Etat sanitaire d'*Apis m. unicolor* à Madagascar ?

Objectif 2-3-4

Partenaires :

Université d'Antananarivo, Associations des apiculteurs

Thèse : Henriette Rasolofoarivao

Co-tutelle Université d'Antananarivo / Cirad

L. Raveloson – B. Reynaud

Co-Encadrement : Delatte / Clémencet



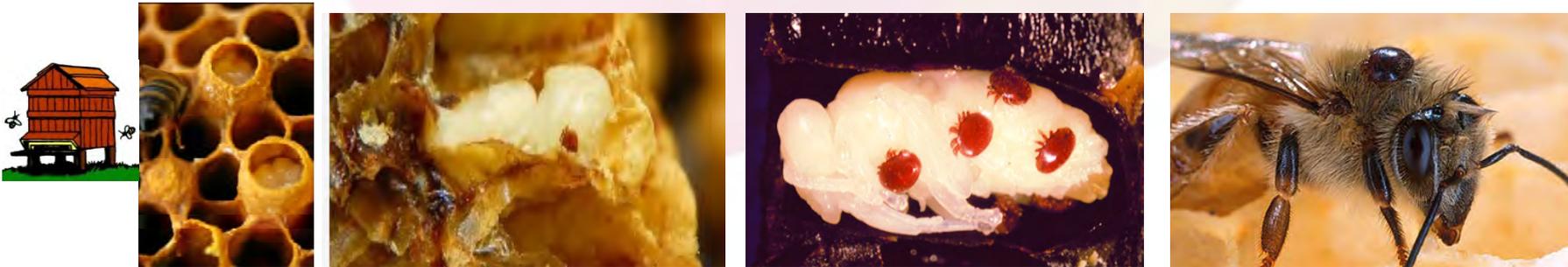
Arrivée de l'acararien *Varroa destructor* à Madagascar !



- Etroitement associé au syndrome « d'effondrement des colonies » (CDD) (*Le Conte et al., 2010*)
- => Menace pour l'apiculture et indirectement la biodiversité dans le zone OI

Ecto-parasite obligatoire du genre *Apis*

- ❑ **Pour se reproduire** : Ponte des œufs et accouplement des les cellules de couvain
- ❑ **Pour se nourrir** : pompent les réserves dans les loges et sucent l'hémolymphe des larves, pupes, et adultes
- ❑ **Pour se disperser** : via les ouvrières, mâles ou reines parasités



Reproduction



Survie



Dispersion



Effets pathogènes du varroa



- Directs => action spoliatrice
- Indirects => *via* la transmission et activation de virus

Effets pathogènes directs

Rosenkranz et al., 2010

- Action spoliatrice des ressources de la colonie

Larves



- mortalité plus élevée

Ouvrières adultes



- poids faible (-30%)
- durée de vie plus courte (50%)
- probabilité de retour à la colonie plus faible ...

Mâles



- moins nombreux,
- parfois infertiles

=> Affaiblissement général de la ruche

Effets pathogènes indirects

Genersch and Aubert, 2010

- **Action vectrice de virus**

Transmission de virus dans l'hémolymphe

Activation de virus déjà présents

Indirectement par affaiblissement général du système immunitaire



Malformations
DWV



Paralyse
IAPV, KBV, APV, CBPV



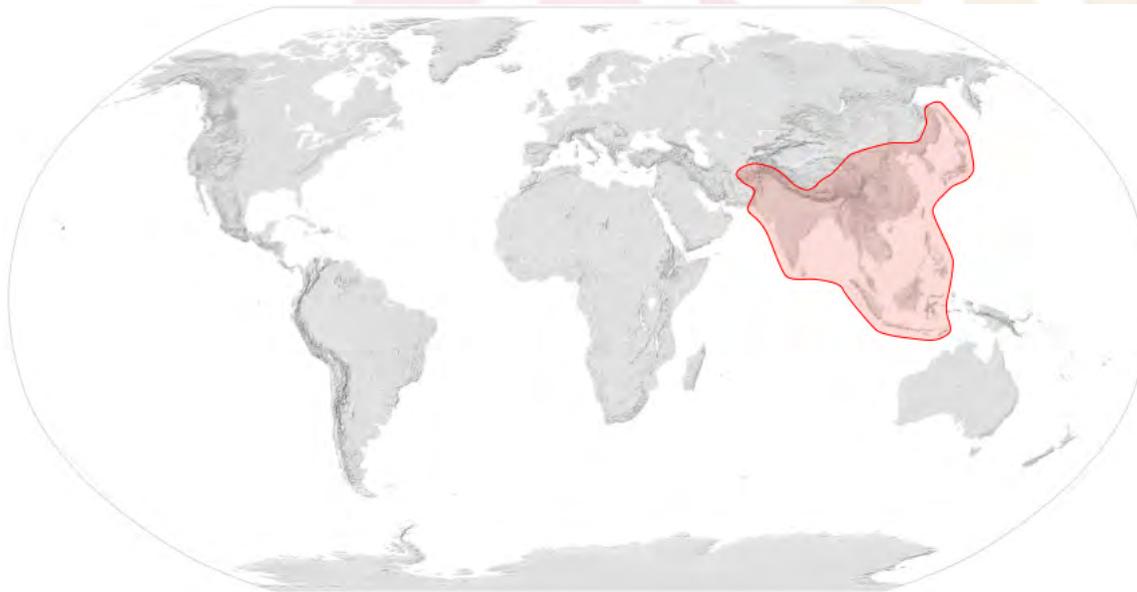
Couvain malade
SBV, BQCV ...



Varroa destructor : origine

Andersen & Trueman, 2000

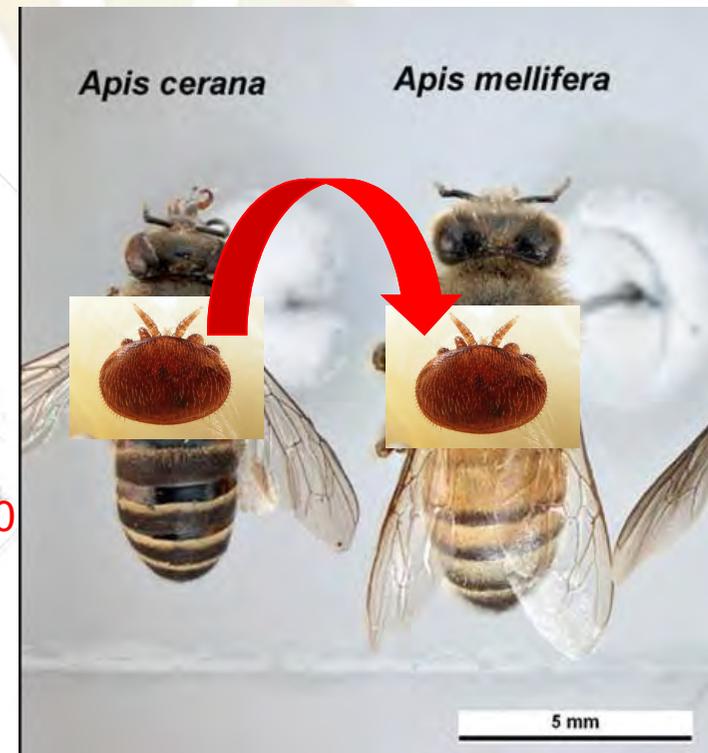
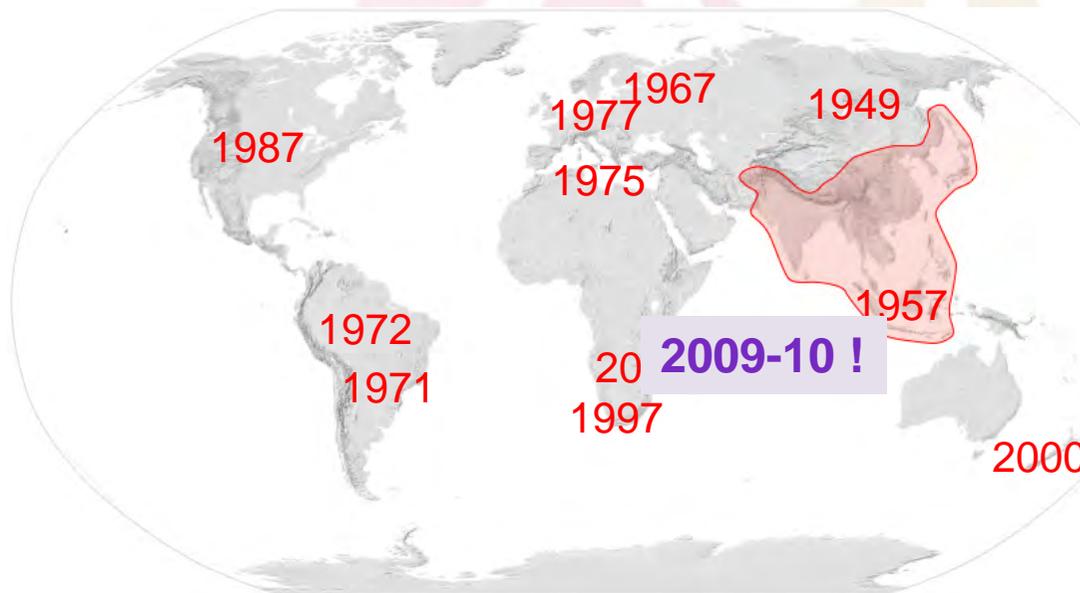
- Hôte naturel => *Apis cerana* (abeille asiatique)



Varroa destructor : expansion mondiale

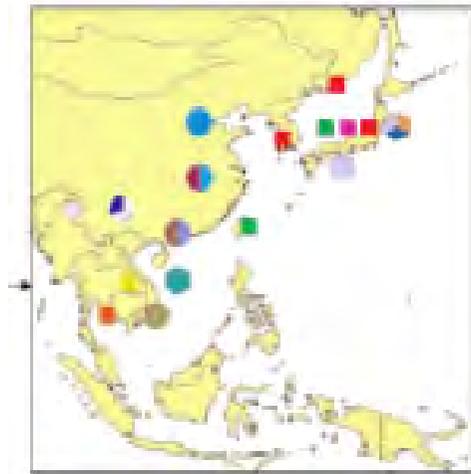
Andersen & Trueman, 2000

- Hôte naturel => *Apis cerana*

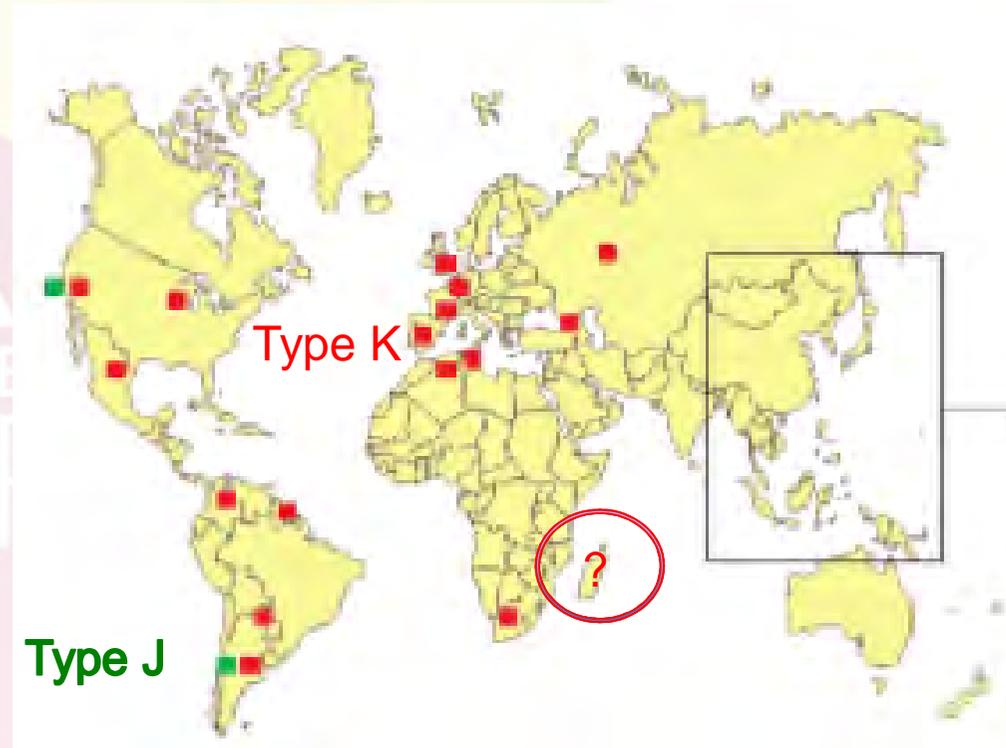


Varroa destructor : 2 lignées invasives

Navajas et al., 2010



Asie
18 lignées
sur *Apis cerana*

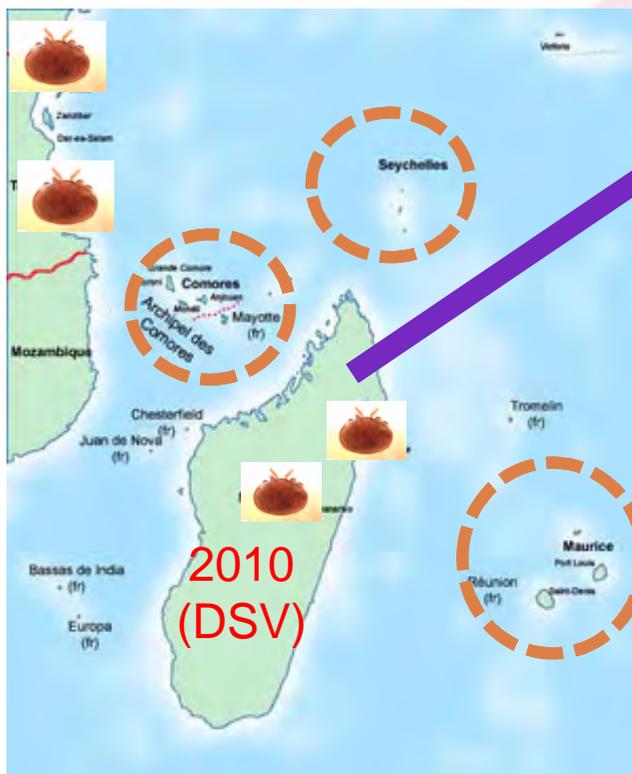


Type J

Type K

... seulement 2 lignées sur *Apis mellifera*

Etat sanitaire de l'abeille à Madagascar ?



Objectif 2 :

Avancée du varroa, impact ?

Lignée et diversité génétique de *V. destructor* ?

Objectif 3 :

Comportement hygiénique d'*A. m. unicolor* ?

Variabilité de la tolérance des colonies ?

Objectif 4 :

Diversité des virus de l'abeille (zones infestées ou non) ?

Objectif 2

Distribution de *V. destructor* à Madagascar



Aout 2011 - février 2012

30 districts - 119 sites visités

691 colonies inspectées

★ 2010 : 4 districts infestés (DSV)

2012 :

▲ 5 nouveaux districts infestés

▲ sites indemnes

⇒ **Distribution limitée rayon 80 km**

⇒ **Vitesse de propagation**

« relativement » lente

Objectif 2

Impact sur les colonies

Janvier 2011
4 ruchés infestés
1 rucher indemne
73 colonies

Janvier 2012
5 ruchers infestés
28 colonies

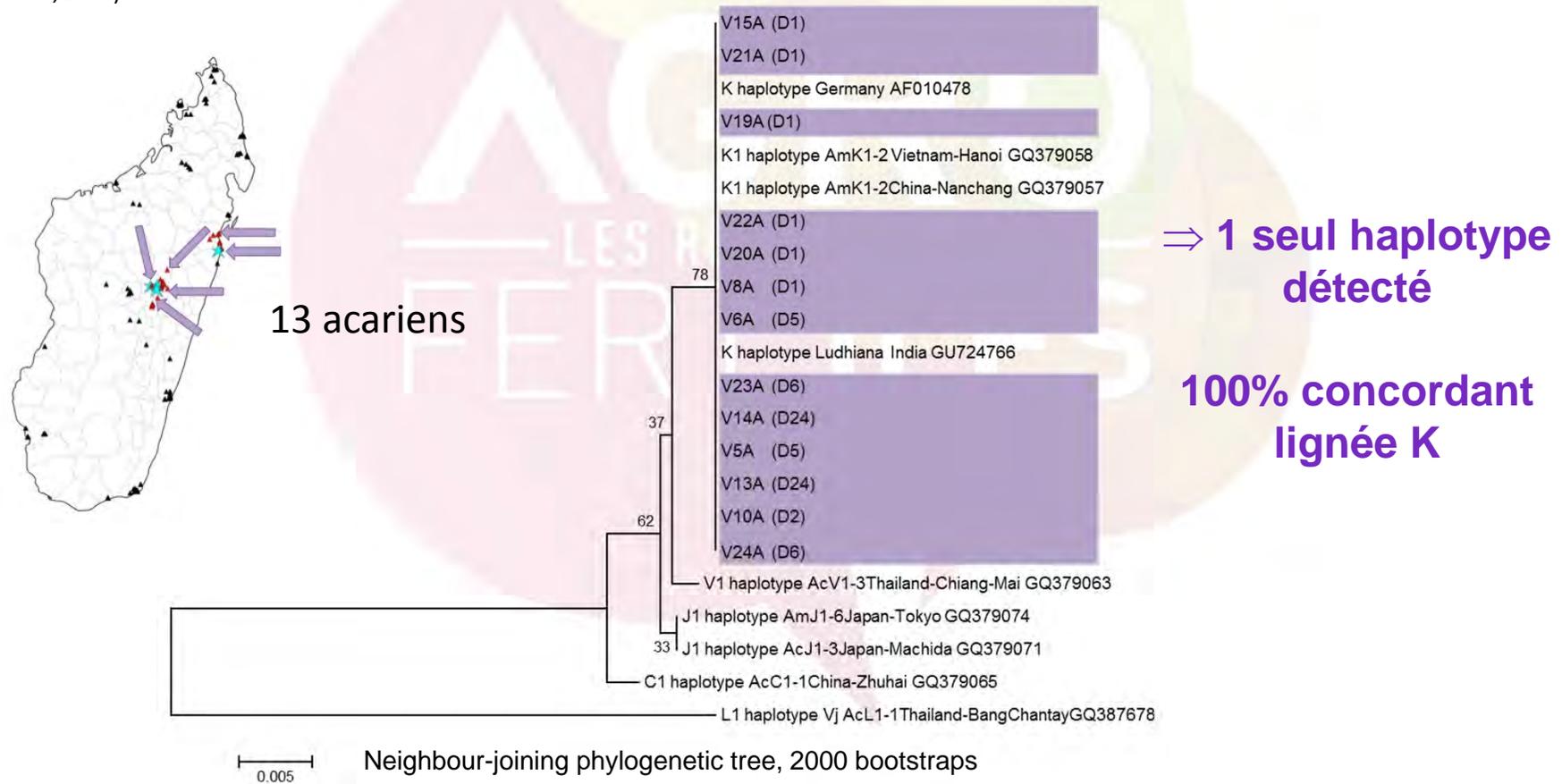


=> Perte de 60 % des colonies

Objectif 2

Identification lignée(s) introduite(s): diversité génétique mitochondriale ?

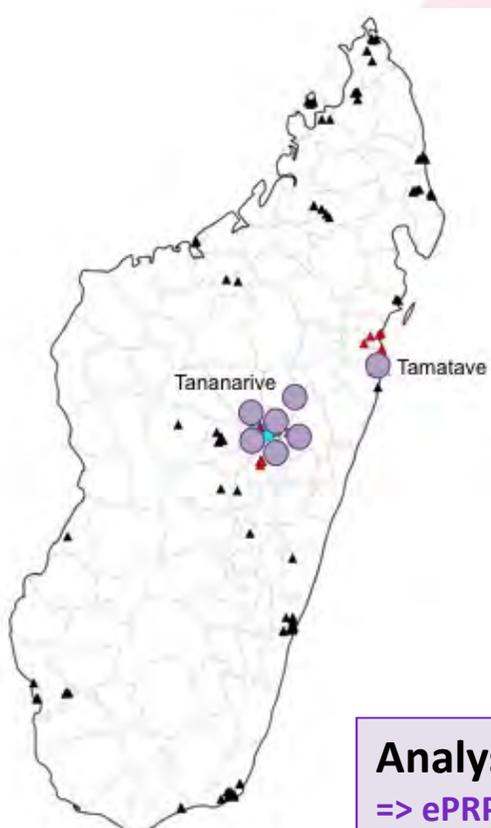
- Séquençage de la région inter-génique COI- COII 467pb Amorces COXF-COXR (Anderson and Fuchs ,1998)



Objectif 2

Introduction(s) unique ou multiples diversité génétique nucléaire ?

- Génotypage pour 12 marqueurs microsatellites (Evans et al 2000, Solignac et al, 2003)



Echantillonnage réalisé en 2013
7 districts, 190 colonies, 496 varroas



Analyse, rédaction et diffusion des résultats prévus pour 2014-2105
=> ePRPV 3

Objectif 2, bilan ePRPV2

Sanitaire

**Typage génétique et distribution
de l'ectoparasite *Varroa destructor*
(Acari: Varroidea)
à Madagascar
depuis sa première description en 2010**

par Henriette RASOLOFOARIVAO, Johanna CLÉMENCET, Lala Harivelo
RAVELOSON-RAVAOMANARIVO, Dimby RAZAFINDRAZAKA, Bernard
REYNAUD, Héliène DELATTE

Travail réalisé dans le cadre de la thèse d'Henriette Rasolofoarivao (financement Cirad-AIRD sud)
en cotutelle avec l'Université d'Antananarivo et l'Université de La Réunion



Rucher du village de Maharidaza, sur les Hauts Plateaux,
à une vingtaine de kilomètres à l'est de la capitale.

290

ISSN 0168-8162

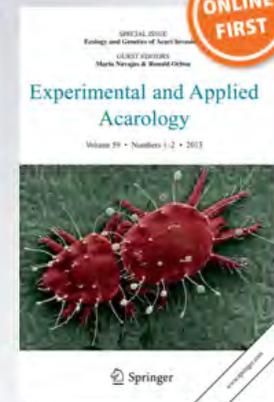
*Spread and strain determination of
Varroa destructor (Acari: Varroidae) in
Madagascar since its first report in 2010*

**Henriette Rasolofoarivao, Johanna
Clémencet, Lala Harivelo Raveloson
Ravaomanarivo, Dimby Razafindrazaka,
Bernard Reynaud, et al.**

Experimental and Applied Acarology

ISSN 0168-8162

Exp Appl Acarol
DOI 10.1007/s10493-013-9658-x



Springer

- Restitution des résultats à Madagascar en présence :
- Ministère de l'agriculture (DPV), ministère de l'apiculture
 - Organisations apicoles (Fenam, BEEFORM)
 - Scientifiques Université Antananarivo

Objectif 3 :

Evaluation du comportement hygiénique

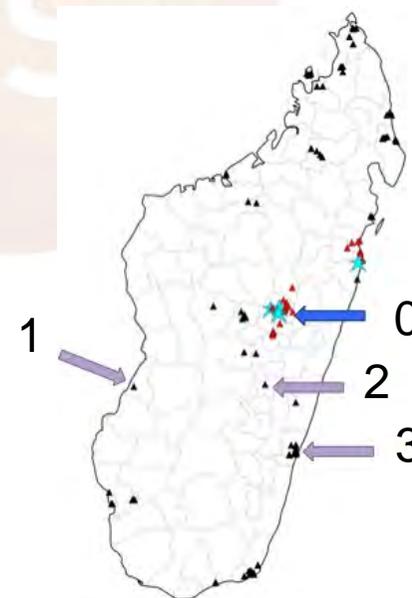
- Capacité des ouvrières à détecter et nettoyer le couvain mort / malade
(*Rothenbuhler WC, 1964*)
- Corrélié à la tolérance des colonies au varroa et autres pathogènes
(loque américaine...) (*Spivak et al. 1996, 1998, 2001*)
- Trait variable et héritable => critère de sélection des colonies dans les
pays infestés (*Spivak et al. 1995, Harbo et al. 1999*)

⇒ Détecter les colonies à fort potentiel de tolérance dans les zones encore non infestées par *V. destructor*

Objectif 3

Evaluation du comportement hygiénique d'*Apis m. unicolor*

- 1 : Mise en place et optimisation du protocole
- 2 : Réalisation des tests dans 3 régions (Morondava, Ambositra et Fianarantsoa)
- 3 : Formation aux apiculteurs



Objectif 3

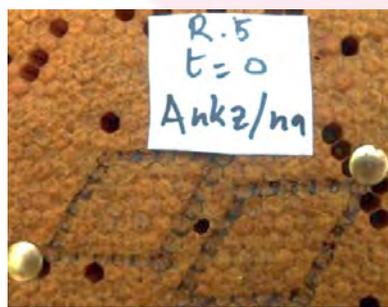
Evaluation du comportement hygiénique : choix et mise au point de la méthode

- Méthode retenue à Madagascar : le « Pin test » (*Espinosa-Montaño, 2008*)



- Très peu couteux
- Faible technicité
- Rapide
- => Réalisable par les apiculteurs eux mêmes

- Mise au point du protocole réalisée en 2013 à Antananarivo
3 ruchers, 10 colonies/rucher, comptage à +4h, +6h
+6h retenue maximise la variabilité des réponses entre colonies



T = 0



T = 4 h



T = 6 h

Objectif 3

Evaluation du comportement hygiénique : étude de la variabilité dans 3 régions non infestées

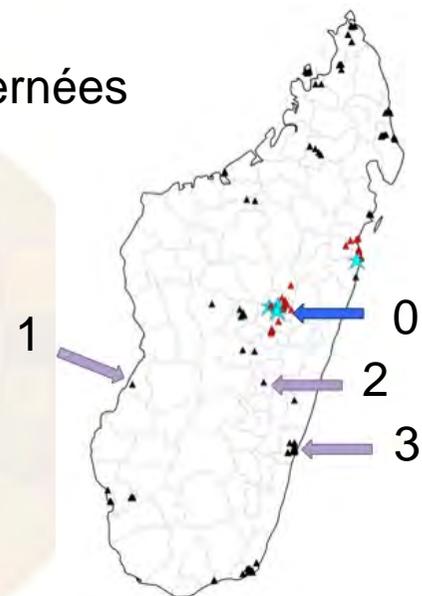
- 3 régions : tests en cours 2013-2015
en lien avec les organisations apicoles des régions concernées

10 ruchers / région

10 colonies / ruchers

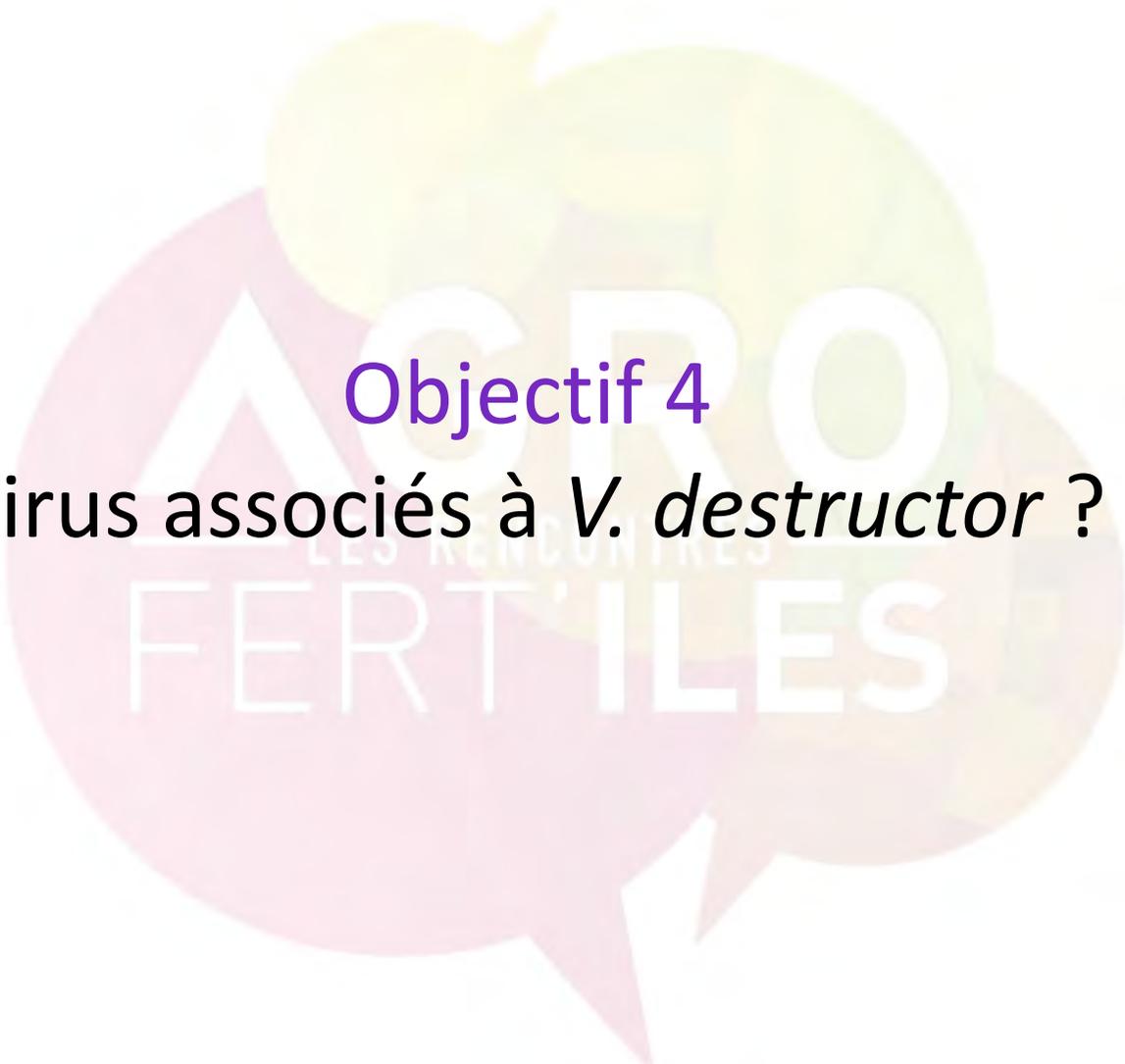
+ répétition à 15 jours => 600 tests

- Formation des apiculteurs : 2013-2015



**Obtention, analyse, rédaction, restitution des
résultats & formation des apiculteurs**

=> ePRPV 3



Objectif 4
Virus associés à *V. destructor* ?

Virus associés (perspectives)

- Virus à tester :
 - ✓ ABPV = Acute Bee Paralysis Virus
 - ✓ BQCV = Black Queen Cell Virus
 - ✓ CBPV = Chronic *Bee Paralysis Virus*
 - ✓ DWV = Deformed Wing Virus
 - ✓ IAPV = Israeli Acute Paralysis Virus
 - ✓ KBV = Kashmir Bee Virus
 - ✓ SBV = Sacbrood Bee Virus
 - ✓ EF-1 α = témoin positif de la qualité des cDNA synthétisés.
- Echantillonnage d'abeilles en 2011, 2012, et 2013 sur 83 ruchers géographiquement réparti sur 8 régions, 14 districts et 38 sites.

ECOLOGIE DE L'ABEILLE

Objectif 5

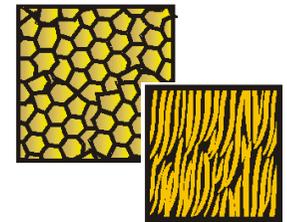
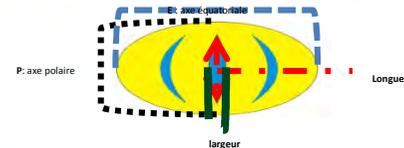
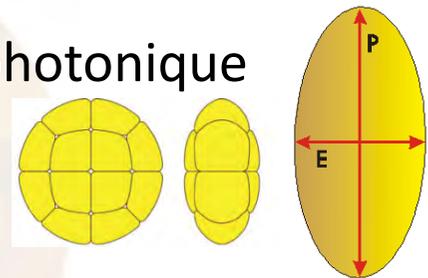
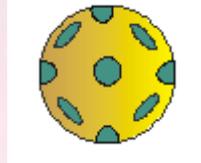
Création d'une banque de pollens de l'Océan Indien

Méthodes préconisées

• Étude des pollens :

- Pollen acétolysé (ERDTMAN, 1952).
- Étude morphologique des pollens au microscope photonique (Mph):

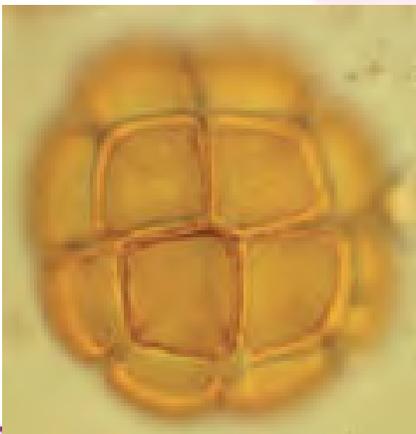
- la **forme et la symétrie** du grain de pollen,
- les **dimensions**
- les **apertures**.
- les **caractères de l'exine**: structure et sculpture
- la **biométrie**.



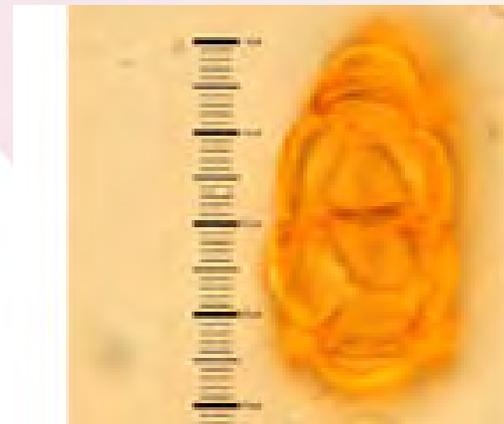
Exemple de description

- ***Albizzia lebbek* (FABACEAE)**

- **Symétrie et forme** : polyade, formé par 16 monades, elliptique subcarée en vue de face, elliptique en vue de profil
- **Dimensions** : Grand axe (D) : 69 μm (60 μm à 78 μm) ; Petit axe (d) : 49 μm (46 μm à 52 μm)
- **Apertures** : complexe, chaque monade comporte 4 pores distaux et sillons parasyncolpées
- **Exine** : tectée, lisse. Épaisseur totale de l'exine : 1 μm environ. Structure de l'exine indistinct.



Vue de face



Vue de profil

Image assemblée



Ipomea obscura
Convolvulaceae
Petit liseron

Image assemblée



Strobilanthes hamiltonianus

Acanthaceae

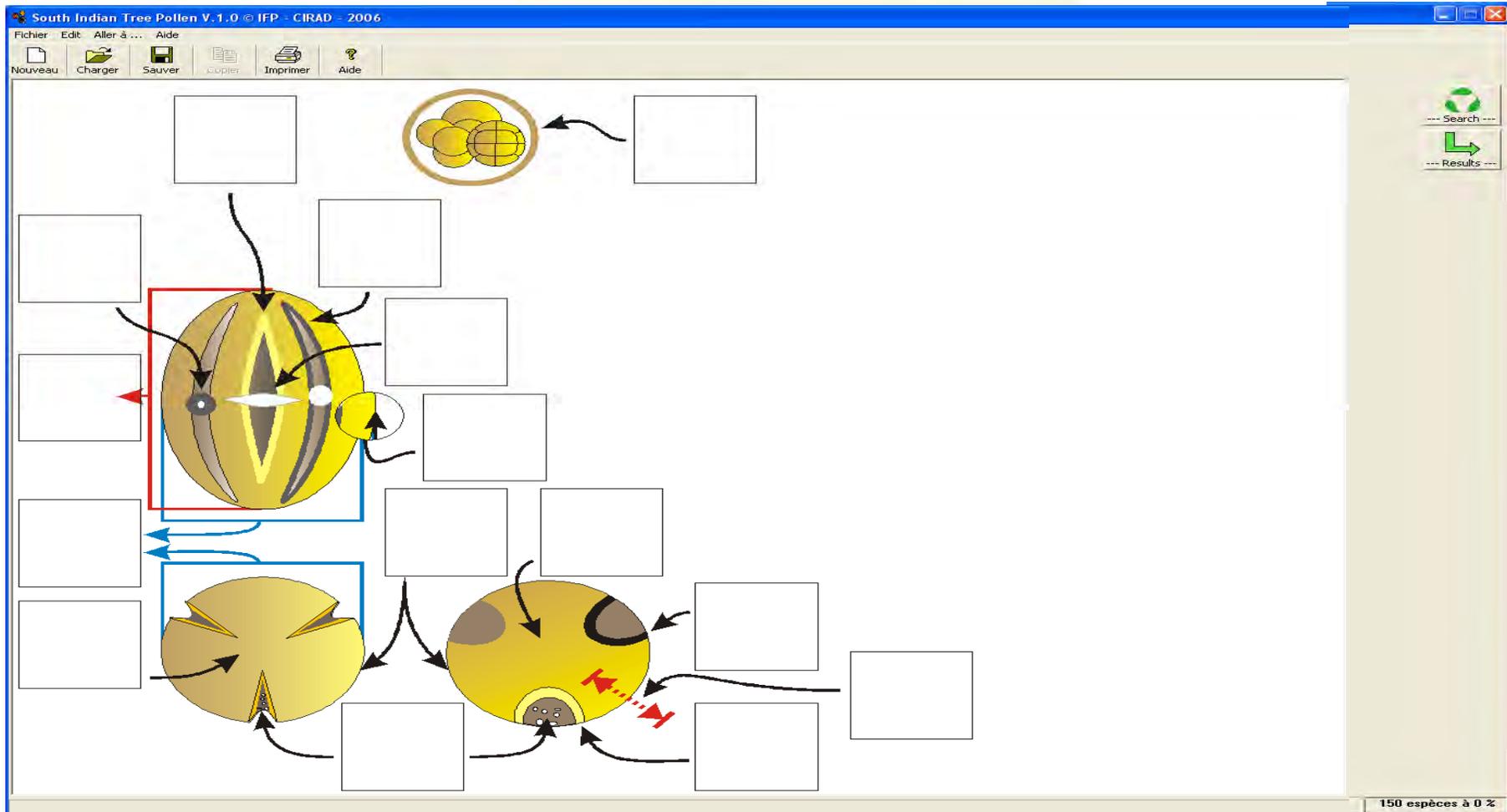
Califon



Construire le portrait-robot du pollen à identifier

Le schéma d'un grain de pollen théorique

Tous les caractères descriptibles : (la taille, la forme, le nombre et la forme des ouvertures (pores et sillons) et l'architecture de la membrane externe (exine).)



L'utilisateur est libre du choix des caractères à décrire.

A chaque étape de l'identification, un coefficient de similitude est calculé pour toutes les espèces connues par le logiciel. Elles sont alors triées par ordre décroissant de similitude (bouton résultats).

South Indian Tree Pollen V.1.0 © IFP - CIRAD - 2006

Alstonia scholaris (L.) R. Br. - APOCYNACEAE

Pollen Morphology :
 Symmetry and Form : Monad, radial symmetry, isopolar or subsopolar (syncolpate at one pole) 2- or 3-colporate; elliptic (E > P) in equatorial view; circular (3-ap.) or elliptic (2-ap.) in polar view.
 Dimensions : Polar Axis = 20-28 µm; Equatorial Axis = 26-31 µm.
 Apertures : Two or three colpora, Colpus elliptic; colpus apex acute or obtuse, frequently syncolpate at one pole, aperture membrane granular, distance between the adjacent colpal apices 15-17 µm, margin undifferentiated, costae colpi absent, Os: circular (d = 4 µm) to ellipsoidal with irregular outline, oral costae present.
 Exine : Foveolate, tectate, infratectum columellate, exine thickness at the mid-point of the intercolpium ±2.0 µm.
 Remark : A eurypalynous genus characterised by four pollen types.
 On the basis of endoaperture type and aperture number and pollen size, four pollen types can be distinguished [Kuijtt, J. & Van der Ham, R.W. (1997: Table 2)].

Tentative Pollen Typification : *Alstonia* type X.

References (Generic Palynology) :
 LM (micrographs) of *Alstonia* in Guinet, Ph. 1962; SEM (micrograph) of *A. scholaris* (fig. 10) along with those of other species of *Alstonia* in Kurjit, J. & Van der Ham, R.W. (1997: figs. 1-12).

Origin of the specimen studied :
 Tamil Naur: Nilgiris, Eastern slope toward 1200m, Ph. Guinet, 27.04.1961, HIFP, Pollen Slide N°: IFP 689.

Ecology & Taxonomy :
 A large evergreen tree.
 Both in deciduous and evergreen forests up to 700m from the plain up to 1100m; in dense deciduous wet forests.
 Leaf illustration: Pascal, J-P. & Ramesh, B.R. (1987), fig. 32
 Generic description and specific key in Flora of Madras: p. 569 (Gamble, J.S., 1967).

Distribution of *Alstonia scholaris* :
 Northern Circars, not very common.
 Deccan; Western Ghats: in all Districts.
 South India especially Western Ghats.

Species List (sorted by similarity):

- 100% - *Alstonia scholaris*
- 91% - *Antiaris toxicaria*
- 91% - *Avicennia officinalis*
- 91% - *Bentlicia condapanna*
- 91% - *Caryota urens*
- 91% - *Cycas revoluta*
- 91% - *Goniothalamus cardiopetalus*
- 91% - *Gymnacronihea canarica*
- 91% - *Knema attenuata*
- 91% - *Leptonychia moacurroides*
- 91% - *Michelia nilagirica*
- 91% - *Myristica dactyloides*
- 91% - *Pinanga dicksonii*
- 91% - *Syzygium densiflorum*
- 82% - *Actephila excelsa*
- 82% - *Aegiceras corniculatum*
- 82% - *Aglala elaeagnoides*
- 82% - *Agrostitachys neeboldii*
- 82% - *Apodytes dimidiata*
- 82% - *Ardisia thomboidea*
- 82% - *Artocarpus heterophyllus*
- 82% - *Atalantia wightii*
- 82% - *Baccaurea courallensis*
- 82% - *Bambusa arundinacea*
- 82% - *Barringtonia racemosa*
- 82% - *Bauhinia racemosa*
- 82% - *Bhesa indica*
- 82% - *Bischofia javanica*
- 82% - *Blachia denudata*
- 82% - *Blepharistemma membranifolium*
- 82% - *Bruguiera gymnorhiza*
- 82% - *Calophyllum apetalum*
- 82% - *Canarium strictum*
- 82% - *Capparis stylosa*
- 82% - *Carallia brachiata*
- 82% - *Careya arborea*
- 82% - *Cassia ovata*
- 82% - *Celtis tetrandia*
- 82% - *Ceriops decandra*
- 82% - *Chrysophyllum lanceolatum*
- 82% - *Clausena indica*
- 82% - *Clerodendrum viscosum*
- 82% - *Croton type*
- 82% - *Cullenia exarillata*

1 espèces à 100 %



Questions ?

