

Conséquences génétiques de la production de larves d'huîtres en écloserie : étude des processus de dérive et de sélection

Nicolas TARIS⁽¹⁾, Christopher SAUVAGE⁽¹⁾, Frederico M. BATISTA⁽¹⁾,
Sophie BARON⁽²⁾, Bruno ERNANDE⁽³⁾, Pierrick HAFFRAY⁽⁴⁾,
Pierre BOUDRY^{(1)*}

⁽¹⁾ Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER), Laboratoire de Génétique et Pathologie (LGP), 17390 La Tremblade, France

⁽²⁾ Laboratoire d'analyses génétiques GENINDEXE, 17000 La Rochelle, France

⁽³⁾ Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER), Laboratoire Ressources Halieutiques, Avenue du Général de Gaulle, BP 32, 14520 Port-en-Bessin, France

⁽⁴⁾ SYSAAF, Station SCRIBE, INRA, Campus de Beaulieu, 35042 Rennes, France

Abstract: Genetic consequences of production of Pacific oyster larvae in hatchery: drift and selective pressures related to rearing practices. Previous studies have shown heritable variation in larval developmental traits in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. In order to study the genetic consequences of production of oyster larvae in hatcheries, two factors, specific to hatcheries, were examined: the effect of discarding the smallest larvae (*i.e.* culling) and the effect of temperature (20°C *versus* 26°C). A mixed-family approach was used in order to infer the genetic composition of larval populations and family assignment, limiting possible environmental bias and allowing the study of a relatively large number of families using a limited number of larval tanks. Our results show that three multiplexed highly polymorphic microsatellite markers are a powerful tool for family assignment and, consequently, for the study of bivalve larvae genetics. Culling, by selective sieving of the smallest larvae is an advantageous practice at a phenotypic scale as it reduced variance in larval size, variance of developmental rate and time to settlement. Culling of 50% of the larval population only led to 15% less spat, showing a positive phenotypic correlation between larval growth and settlement success. However, culling represents a substantial risk for diversity loss, because it increases the variance of reproductive success among parental oysters. The effective population sizes of early settling cohorts of settlement were lower than those of later ones. Our results show that the settlement of slow growing larvae significantly contributes to minimizing the variability of reproductive success and therefore to maximizing genetic diversity. These results corroborate the low estimations of variability of broodstocks sampled in several French commercial hatcheries, relative to natural populations. The genetic composition of the larval population and the resulting spat

* Correspondance et tirés à part : pierre.boudry@ifremer.fr

was significantly different between the two tested temperatures, revealing genotype x environment interaction for survival. Similarly, genotype x environment interaction was also observed for larval growth as a higher temperature exerted a positive influence on the expression of genetic variability for this trait. Consequently, we can conclude that a temperature of 26°C coupled with culling, to common practice in oyster hatcheries, is likely to amplify the selection pressure for fast growing larvae. To test for this hypothesis, we compared larval developmental traits in the progeny of a hatchery broodstock closed for 7 generations, with the progeny of wild oysters and the two possible hybrids. Our results show that selection of fast growing larvae can counteract presumed inbreeding depression, due to higher mean relatedness among hatchery broodstock than in the wild. Genetic effects of intensive rearing conditions at larval stage are significant and should be taken into account in hatchery practices, especially in terms of genetic diversity management.

***Crassostrea gigas* / larvae / selection-domestication / genetic diversity / hatchery**

Résumé : Afin d'étudier les conséquences génétiques des pratiques de production en éclosion d'huître creuse, deux facteurs ont été examinés : l'élimination des petites larves et la température. Nos résultats montrent que l'assignation de parenté par marqueurs microsatellites est un outil performant pour les études génétiques en phase larvaire de familles élevées en mélange. Bien qu'avantageux d'un point de vue phénotypique, le tamisage sélectif représente un risque de perte de diversité. La fixation des larves à croissance lente permet en effet de minimiser la variabilité du succès reproducteur et de fait, de maximiser la variabilité génétique. Ces résultats corroborent les estimations de variabilité sur les stocks d'écloseries françaises où l'on constate une diversité allélique inférieure à celle de populations issues du milieu naturel. La température exerce également une influence sur la précocité de l'expression de la variabilité génétique pour la croissance larvaire. Ainsi une température élevée associée à une procédure de tamisage peut amplifier l'effet sélectif. Enfin, la sélection de larves à croissance rapide semble démontrée, s'opposant à la dépression de consanguinité présumée. Les conditions d'élevage peuvent donc avoir un effet génétique significatif qui devrait être pris en considération dans les pratiques d'éclosion, notamment dans la gestion de la diversité génétique.

***Crassostrea gigas* / larve / sélection-domestication / diversité génétique / éclosion**

1. INTRODUCTION

Les mollusques marins occupent une place particulière au sein des animaux d'élevage. A l'instar des poissons, la plupart des espèces sont encore peu voire pas domestiquées, au sens zootechnique du terme [43]. En effet, la particularité du cycle de vie, alternant phase larvaire libre et adulte benthique, ne permet pas toujours une maîtrise complète des cycles d'élevage et de

reproduction. Cette phase larvaire, généralement synonyme de forte fécondité [45] est aussi associée à une forte mortalité [42], [35].

Pour l'huître du Pacifique *Crassostrea gigas*, mollusque le plus produit à l'échelle mondiale (4,4 millions de tonnes en 2003 [13]), les techniques de reproduction en milieu contrôlé sont aujourd'hui bien maîtrisées grâce à un savoir-faire développé depuis plusieurs décennies, permettant désormais d'alimenter de manière croissante une production dominée en France par le captage naturel [23]. Que la reproduction soit issue d'éclosérie ou du milieu naturel, le reste du cycle d'élevage est néanmoins réalisé dans le milieu naturel. La phase larvaire est donc la seule particulièrement « sensible » aux effets potentiels de la production en milieu artificiel.

Compte tenu d'une demande de production de naissain d'éclosérie sans cesse croissante, la question des conséquences de cette domestication zootechnique en phase larvaire se pose pour cette espèce, à la fois sur un plan très pratique de maintien de la variabilité génétique, mais également en terme de sélection de caractères pour un élevage performant.

L'objectif général de ce travail a été d'identifier les conséquences génétiques de certaines pratiques zootechniques d'élevage larvaire. Notre étude a plus particulièrement porté sur deux éléments :

- le tamisage sélectif (sélection sur le taux de développement larvaire), appliqué afin d'éliminer les plus petites larves pour ainsi homogénéiser et réduire les temps d'élevage.
- la température, facteur majeur de l'environnement d'élevage ayant une implication directe dans le taux de développement et donc la durée de la phase pélagique chez de nombreux invertébrés benthiques marins [1].

Nous avons également suivi la descendance de deux populations de géniteurs, l'une issue d'éclosérie, l'autre sauvage, afin de tester l'hypothèse d'une sélection de larves à croissance rapide en éclosérie.

En parallèle, nous avons échantillonné différents lots de géniteurs afin d'obtenir une image de la diversité génétique de stocks issus d'écloséries commerciales en France.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. Estimation de la variabilité génétique des stocks en éclosérie commerciale

Le niveau de diversité génétique de différents lots d'éclosérie commerciale (4 écloséries ici nommées A, B, C et D) a été évalué sur la base de trois

marqueurs microsatellites (CG49, CG108 [27] et L10 [20]) et comparé à celui de deux populations sauvages de référence d'effectifs équivalents (toutes deux issues de captage naturel en bassin de Marennes-Oléron). Pour chacun des lots, plusieurs paramètres ont été estimés : le nombre d'allèles par locus, l'hétérozygotie observée (H_o) ainsi que l'hétérozygotie attendue sous l'hypothèse de l'équilibre de Hardy-Weinberg ($H_n.b.$), estimateur non biaisé d'hétérozygotie [29] tel que :

$$H_n.b. = [2n/(2n-1)].[1-\sum x_i^2]$$

avec x_i la fréquence du i^e allèle, n étant la taille de l'échantillon.

Le F_{is} a également été calculé comme indice de fixation [44]. Les calculs de ces paramètres ont été réalisés à l'aide du logiciel GENETIX (version 4.05, [3]). Enfin, la fréquence des allèles nuls a été déterminée selon les méthodes de Chakraborty [8] et Brookfield [7].

2.2. Protocoles expérimentaux d'élevage

2.2.1. Effets sélectifs du tamisage

Afin d'étudier les effets d'une sélection des larves à croissance rapide par tamisage, différents caractères phénotypiques (croissance, survie, succès à la métamorphose) ont été suivis pour une population larvaire issue d'un croisement factoriel (3 femelles x 10 mâles, soit 30 familles). Nous avons utilisé une approche de familles élevées en mélange afin de réduire les éventuels biais environnementaux [17]. Cette méthode implique une assignation rétrospective des individus aux familles. Pour cela, nous avons utilisé le jeu de trois marqueurs microsatellites précité en multiplexage [41]. Deux types d'élevage ont été suivis en parallèle (trois bacs de 50 litres pour chaque élevage). Pour le premier, les plus petites larves ont été progressivement éliminées par tamisage sélectif. Pour le second, la totalité de la population a été conservée jusqu'à métamorphose. L'intensité du tamisage sélectif a été ajustée de façon à éliminer 50 % des larves et ce de manière progressive sur toute la durée de l'élevage. Lorsque les larves ont atteint le stade pédivéligère, une fraction a été prélevée pour analyse génétique. La « taille efficace » de population a ainsi été calculée d'après les données de contribution des fractions de larves pédivéligères échantillonnées. La formule utilisée est celle de Robertson [34] :

$$N_e = (\sum n_{ij})^2 / \sum n_{ij}^2$$

où n_{ij} est le nombre observé de descendants issus du mâle i et de la femelle j dans un échantillon donné.

2.2.2. Effets de la température sur le développement précoce

Afin d'étudier l'effet de la température, une même approche de famille en mélange a été mise en oeuvre. La descendance issue d'un croisement factoriel (4 femelles x 12 mâles, soit 48 familles) a été répartie en bacs d'élevage maintenus à 26 °C et 20 °C (trois bacs par condition). L'ensemble des larves a été conservé pour cette expérience (pas de sélection par tamisage). Des mesures individuelles de taille de larve ont été effectuées 22 jours après fécondation pour les deux conditions et 30 jours après fécondation à 20 °C. Les larves mesurées ont été génotypées puis assignées. Des mesures de taille sur naissain génotypé ont aussi été réalisées 80 jours après fécondation. Ce naissain est issu de cohortes de larves fixées précocement ou tardivement.

2.2.3. Mise en évidence d'une réponse à une sélection précoce

Deux populations de géniteurs ont été utilisées pour cette expérience : la première composée des 47 individus de la population témoin sauvage 2, la seconde représentée par les 37 individus du lot 2 de l'éclosérie A, issus de sept générations de reproduction et de sélection massale. Les larves produites selon quatre types de croisement (femelles sauvages x mâles sauvages, (SxS), femelles d'éclosérie x mâles d'éclosérie (ExE), et les croisements hybrides correspondants (SxE ; ExS)) ont été suivies au travers de différents paramètres : croissance, survie et succès à la fixation (ou métamorphose). La distribution des fréquences de taille des larves a été examinée par analyse des progressions modales. La décomposition modale a été déterminée sur la base des méthodes de Bhattacharya [4] et NORMSEP [17] via le logiciel FISAT [14]. Des estimations de parenté ont également été déterminées selon la méthode des moments [33] entre tous les couples potentiels de géniteurs (340 paires dans le cas de la population d'éclosérie (20 femelles, 17 mâles) et 462 pour la population sauvage (33 femelles, 14 mâles)).

2.3. Analyses statistiques des données

Les analyses statistiques relatives aux données phénotypiques et génétiques des différents protocoles expérimentaux impliquent deux types d'effets qualifiés de fixes (exemple : effet du traitement) et aléatoires (exemple : effet d'interaction). En conséquence, les données suivant une distribution normale ont été analysées en utilisant le principe des modèles linéaires mixtes (Proc MIXED, SAS/STAT® software [37]). Les données suivant une loi binomiale ou de Poisson ont été analysées sur le modèle mixte généralisé suivant la Macro-procédure GLIMMIX (équivalent à MIXED pour les données ne suivant pas une normale) du logiciel SAS [25]. Pour les deux procédures, les tests de significativité pour les effets fixes sont basés sur une statistique F. Pour les effets aléatoires, les tests sont basés sur les rapports de

vraisemblance entre sous-modèles, lesquels suivent de manière asymptotique une distribution du χ^2 [25].

3. RÉSULTATS

3.1. Variabilité génétique des stocks en éclosion commerciale (tab. I)

3.1.1. Diversité allélique

Comparées à la moyenne des deux populations témoins (32 allèles multilocus), les populations des éclosions A, B et D présentent environ 60 % de leur diversité allélique (50 à 77 % selon les loci). En moyenne, elles présentent entre 10 et 15 allèles par locus (contre 30 et 34 pour les populations sauvages). Considérant 7 générations de sélection (lots 1 et 2 de l'éclosion A), la diminution moyenne par génération à partir d'une population sauvage comparable à nos témoins serait donc sensiblement inférieure à 10 %. Seuls les lots de l'éclosion C montrent une diversité allélique comparable à celle des témoins sauvages.

3.1.2. Hétérozygotie

Les lots des éclosions A, C et D présentent une hétérozygotie multilocus, respectivement 21 %, 17 % et 6 % inférieure aux populations témoins, passant d'une valeur moyenne de 0,84 à des valeurs comprises entre 0,66 et 0,79. Par ailleurs, une forte variance est observée entre les loci : L10 présentant jusqu'à 50 % de baisse d'hétérozygotie et CG49 une augmentation de 19 % pour les lots de l'éclosion D. A contrario, les lots de l'éclosion C présentent des valeurs observées très élevées. En analyse multilocus, près de 99 % des individus sont observés comme hétérozygotes. Concernant les valeurs de F_{is} , les valeurs multilocus sont significativement supérieures à 0 pour l'ensemble des populations échantillonnées, exception faite de la population éclosion B dont l'hétérozygotie observée est systématiquement plus élevée que l'hétérozygotie attendue non biaisée.

Production de larves d'huîtres en éclosion

Tableau I : Paramètres généraux de l'analyse de variabilité génétique des populations échantillonnées (pour les éclosions A, C et D, deux lots correspondants à différents stocks de géniteurs ont été analysés).

		Témoin 1	Témoin 2	Éclosion A		Éclosion B	Éclosion C		Éclosion D	
				Lot 1	Lot 2		Lot 1	Lot 2	Lot 1	Lot 2
	N	50	47	49	37	65	50	50	50	50
Cg108	Nb individus	50	46	49	37	64	49	50	50	46
	Nb allèles	32	37	13	9	13	29	26	9	17
	H _{obs}	0,880	0,891	0,796	0,590	0,984	0,714	0,680	0,840	0,804
	H _{n.b.}	0,957	0,974	0,719	0,610	0,868	0,958	0,953	0,817	0,905
	F _{is}	0,085	0,086	-0,108	0,028	-0,135	0,256	0,288	-0,028	0,112
		*	*	ns	ns	ns	**	**	ns	*
	r _C	0,04	0,04	-0,05	0,02	-0,06	0,15	0,17	-0,01	0,06
	r _B	0,04	0,06	0	0,01	0,02	0,14	0,14	0,00	0,05
L10	Nb individus	50	47	49	37	65	50	50	50	46
	Nb allèles	33	37	10	8	11	32	30	9	15
	H _{obs}	0,900	0,894	0,449	0,65	1,000	0,500	0,580	0,913	0,747
	H _{n.b.}	0,965	0,969	0,801	0,80	0,844	0,960	0,960	0,500	0,587
	F _{is}	0,068	0,079	0,442	0,198	-0,186	0,481	0,398	0,333	0,359
		*	*	**	**	ns	**	**	**	**
	r _C	0,04	0,04	0,28	0,10	-0,09	0,31	0,25	0,20	0,22
	r _B	0,03	0,04	0,20	0,08	0,00	0,23	0,19	0,14	0,17
Cg49	Nb individus	50	46	49	37	65	50	50	50	46
	Nb allèles	25	28	13	13	13	30	30	11	13
	H _{obs}	0,640	0,804	0,735	0,712	0,985	0,860	0,880	0,880	0,913
	H _{n.b.}	0,939	0,944	0,888	0,900	0,888	0,961	0,961	0,838	0,872
	F _{is}	0,320	0,150	0,174	0,198	-0,110	0,105	0,085	-0,050	-0,046
		**	*	**	*	ns	**	*	ns	ns
	r _C	0,19	0,08	0,09	0,11	-0,05	0,06	0,04	-0,02	-0,02
	r _B	0,15	0,09	0,08	0,09	0,00	0,05	0,04	0,00	0,00
Multilocus	Nb allèles	30	34	12	10	12	30	29	10	15
	H _{obs}	0,807	0,863	0,660	0,66	0,990	0,691	0,713	0,801	0,768
	H _{n.b.}	0,954	0,962	0,803	0,77	0,867	0,960	0,958	0,793	0,897
	F _{is}	0,155	0,104	0,180	0,15	-0,144	0,282	0,257	0,077	0,145
	**	**	**	**	ns	**	**	*	**	

Les indices F_{is} sont suivis d'un test de significativité en effectuant un certain nombre de permutations (1 000) sur le fichier de données, l'idée sous-jacente est d'obtenir la distribution de l'estimateur sous l'hypothèse nulle H₀, la valeur observée sur les données réelles est ensuite comparée à la distribution obtenue, et permet d'obtenir une estimation de la probabilité avec une valeur > ou = à la valeur observée sous H₀ ; (ns) correspond à des valeurs non significatives de p, * de p < 0,05 et ** p < 0,01 après correction de Bonferroni sur les locus.

3.2. Effets sélectifs du tamisage

3.2.1. Caractères phénotypiques

La procédure progressive de tamisage sélectif a abouti à une réduction moyenne de l'effectif de la population d'environ 50 % (pourcentage cumulé sur la durée de l'élevage) par rapport au témoin. Conséquence de cette pratique sélective, la proportion de larves restantes 17 jours post-fécondation est de 46,8 ± 9,2 % pour le témoin contre 30,5 ± 5,3 % pour la condition avec tamisage. A partir de ces résultats, il est possible de déduire que la mortalité

non liée au tamisage est de 14,2 % plus importante dans la condition témoin après 17 jours. Ceci repose sur le postulat que dans la condition « tamisage », considérant 50 % d'élimination, 61,1 % de larves devraient être présentes 17 jours post-fécondation (signifiant aussi que cette fraction de larves éliminées par tamisage ne serait pas morte « spontanément » à cette date si elle n'avait pas été éliminée).

Cette sélection sur la taille a également un effet sur la croissance larvaire moyenne ($\chi^2 = 427,2$; $p < 0,001$) et sur le coefficient de variation des longueurs moyennes ($\chi^2 = 14,7$; $p < 0,001$) calculés sur l'ensemble de l'élevage. Les ANOVAs réalisées aux différentes dates de filtration montrent que le coefficient de variation des longueurs moyennes diffère entre traitements à partir du 10^e jour d'élevage ($F = 12,6$; $p < 0,001$), même chose pour la taille des larves mais à partir du 13^e jour ($F = 12,5$; $p < 0,001$). La taille moyenne larvaire qui en résulte est de $222,7 \pm 29,3 \mu\text{m}$ (coefficient de variation = 7,5 %) pour la condition sélective contre $204,1 \pm 29,3 \mu\text{m}$ (coefficient de variation = 14,4 %) pour le témoin.

Pour les deux conditions, les premières larves pédivéligères apparaissent 20 jours post-fécondation. La mortalité larvaire reste négligeable après cette date dans tous les bacs. Dans les bacs avec tamisage, les larves ont atteint le stade pédivéligère dans le temps moyen de 21 jours contre 24 jours pour les larves des bacs témoins.

En accord avec la tendance observée pour le coefficient de variation sur la taille, le tamisage sélectif mène à définir une fenêtre temporelle de fixation plus courte (5 jours contre 11, fig. 1). D'autre part, les trois premiers jours de fixation représentent environ 89 % des larves pédivéligères pour la condition sélective. Pour le témoin, les effectifs de larves arrivant à fixation suivent un schéma beaucoup plus progressif, étalé sur une durée plus longue.

Le nombre total moyen de larves atteignant le stade pédivéligère est logiquement plus faible avec tamisage (164 860 contre 240 000). Cependant, le nombre relatif de larves présentes le premier jour qui atteignent ce stade est plus élevé (61,1 % contre 48,8 %). Finalement, le succès à la métamorphose est aussi plus élevé en condition de tamisage ($61,8 \pm 3,9$ % contre $48,6 \pm 16,0$ %), menant à un nombre de juvéniles quasi-équivalent entre les conditions dix jours après fixation.

Production de larves d'huîtres en écloserie

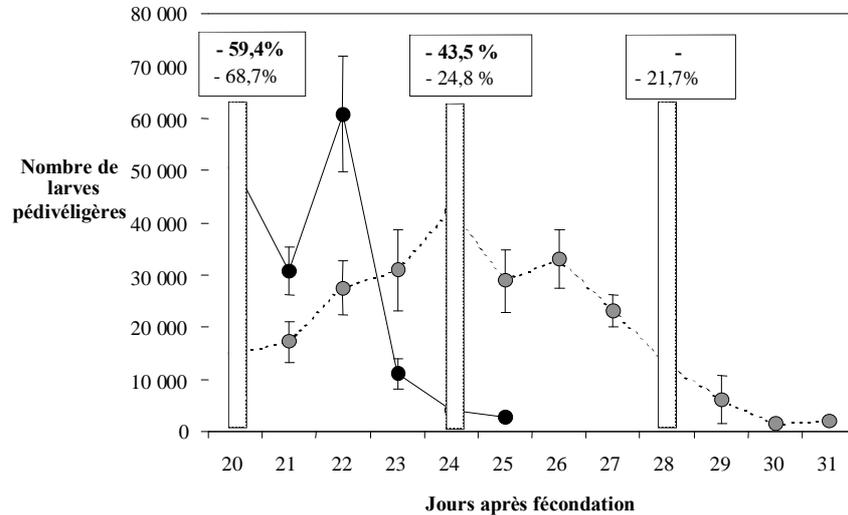


Figure 1 : Évolution temporelle du nombre de larves pédivéligères et estimations des tailles efficaces aux jours 20, 25 et 28 post-fécondation pour les deux conditions d'élevage exprimées en perte de diversité (%) par rapport à la valeur initiale de référence. ● Témoin, sans tamisage ; ● avec tamisage.

3.2.2. Contributions parentales

L'ensemble de l'échantillonnage pour analyse des contributions parentales représente 1440 larves. En effet, 96 larves par réplicat de chaque condition ont été génotypées 20, 25 et 28 jours post-fécondation. Ainsi, 90 % des larves ont été assignées à un couple parental.

Au travers des effets significatifs d'interaction *mâle/temps* et *femelle/temps* (respectivement $\chi^2 = 28,6$; $p < 0,001$ et $\chi^2 = 17,7$; $p < 0,001$), les contributions parentales ont une évolution significative dans le temps. Nous observons ainsi un différentiel des contributions parentales entre larves prêtes à fixer précocement (20 jours post-fécondation) et tardivement (25 ou 28 jours post-fécondation selon la condition d'élevage). Par ailleurs, pour les cohortes de larves arrivées à métamorphose 20 jours post-fécondation, que ce soit en condition de tamisage sélectif ou pour le témoin, il existe un différentiel significatif entre contributions paternelles ($\chi^2 = 16,7$; $p < 0,001$ en condition tamisage ; $\chi^2 = 8,3$; $p < 0,004$ pour le témoin) et maternelles ($\chi^2 = 30,3$; $p < 0,001$ en condition tamisage ; $\chi^2 = 4,2$; $p < 0,04$ pour le témoin). Au 25^e jour post-fécondation, le différentiel de contributions précédemment décrit disparaît, pour laisser place à une homogénéisation des données de contribution. De même, pour la cohorte fixée 28 jours post-fécondation (condition témoin uniquement), les contributions sont plus

homogènes (pas de différences significatives par la voie femelle, $\chi^2 = 0$; $p = 0,99$). Par conséquent, la forte variance du succès reproducteur pour les cohortes précoces n'est pas retrouvée pour les cohortes tardives éliminées par le tamisage.

Ces données sont appuyées par l'évolution de l'effectif efficace « instantané » calculé à chacune des trois dates d'échantillonnage, exprimé en perte de diversité (%) par rapport à la valeur initiale de référence (à la fécondation, fig. 1). Au 20^e jour post-fécondation, la perte de Ne atteint 68,7 % et 59,4 %, respectivement pour le témoin et la condition sélective. Au 25^e jour post-fécondation, les Ne augmentent puisque la perte par rapport à la valeur initiale n'est plus que de 24,8 % pour l'élevage sans tamisage contre 43,5 % avec tamisage. Au dernier point d'échantillonnage, seul le témoin reste, affichant une valeur de l'ordre de la précédente date (-21,7 %).

3.3. Effets de la température

3.3.1. Données phénotypiques au stade larvaire

Dès le premier jour d'élevage, la température influence de manière significative le taux de croissance larvaire ($F = 182,8$; $p < 0,001$). Durant l'élevage, le diamètre moyen des larves placées à 26 °C a toujours été supérieur à celui des larves placées à 20° C. Il existe un effet significatif du traitement sur le taux de croissance larvaire pour l'ensemble de la période d'élevage ($\chi^2 = 401,4$; $p < 0,001$).

L'effet de la température est significatif sur la survie pour l'ensemble de la durée d'élevage ($\chi^2 = 8,1$; $p = 0,004$). A 26 °C, les premières cohortes de larves pédivéligères sont apparues au 23^e jour d'élevage. La fenêtre temporelle de fixation s'est étendue sur 9 jours selon les lots. Nous avons groupé l'ensemble de larves mises en fixation en 3 cohortes de 3 jours. Les premières pédivéligères à 20° C ne sont apparues que 33 jours après fécondation. Pour chaque lot, 9 jours de mise à fixation ont également été observés (divisés en 3 cohortes de 3 jours).

Pour la condition 26° C, $44,0 \pm 4,8$ % des larves présentes 3 jours après fécondation ont atteint la fixation, contre $5,4 \pm 4,2$ % pour la condition 20° C.

A 26° C, le taux moyen de fixation (sur l'ensemble des trois cohortes temporelles) a été de $38,1 \pm 6,0$ %. A 20° C, le taux moyen a été de $6,8 \pm 5,2$ %.

3.3.2. Données de génotypages au stade larvaire

Sur les 2592 larves échantillonnées (3 points d'échantillonnage : 22 jours après fécondation pour les deux conditions et 30 jours après fécondation à

Production de larves d'huîtres en éclosion

20° C), 2073 ont été génotypées et assignées sans ambiguïté à un couple de parents (80 % d'assignation).

3.3.2.1. Contributions parentales

Les contributions (mâles et femelles, fig. 2 et 3) sont distinctes pour le point J22-20 °C des deux autres (comparaison J22-20 °C *vs* J22-26 °C : mâles $\chi^2 = 22,8$; $p < 0,001$, femelles $\chi^2 = 8,6$; $p < 0,001$; comparaison J22-20 °C *vs* J30-20 °C : mâles $\chi^2 = 39,6$; $p < 0,001$, femelles $\chi^2 = 8,2$; $p < 0,001$). Les deux échantillons précédant la phase de fixation sont beaucoup plus proches en terme de contribution (mâles $\chi^2 = 4,1$; $p < 0,04$, femelles $\chi^2 = 0$; ns).

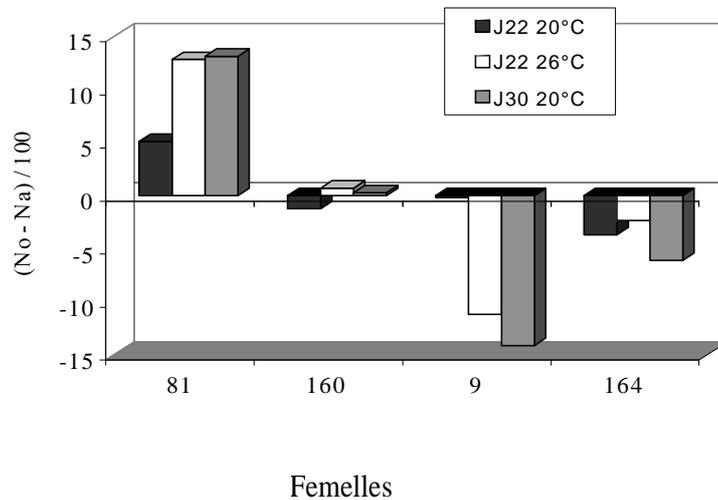


Figure 2 : Différentiel des contributions maternelles entre valeurs observées et attendues en fonction des taux d'éclosion.
No=contribution observée.
Na=contribution attendue.

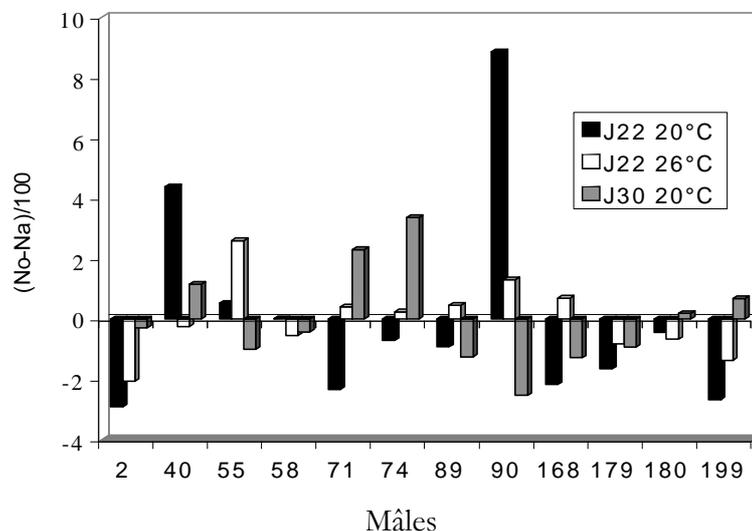


Figure 3 : Différentiel des contributions paternelles entre valeurs observées et attendues en fonction des taux d'éclosion.

No=contribution observée

Na=contribution attendue

3.3.2.2. Croissance

Concernant les mesures de larves génotypées, il n'existe pas de différence entre les points précédant la phase de fixation dans les deux conditions (mâles $\chi^2 = 0,1$; $p = 0,75$, femelles $\chi^2 = 3$; $p = 0,08$). Autrement dit, les familles de demi-frères (voie paternelle et maternelle) ont globalement les mêmes tailles pour ces deux points. A contrario, le point J22-20° C se distingue du point J22-26° C via une différence significative par la voie mâle ($\chi^2 = 11,7$; $p < 0,001$) et du point J30-20° C via une différence significative par la voie maternelle ($\chi^2 = 10,8$; $p < 0,01$).

3.3.3. Données phénotypiques au stade naissain

Le naissain issu de cohortes de fixation tardives présente des tailles inférieures au naissain issu des cohortes plus précoces (fig. 4). Cependant, à 26 °C, la différence entre cohorte tardive et précoce n'est pas statistiquement significative ($\chi^2 = 0,01$; ns). Par contre, à 20° C, le retard reste significatif ($\chi^2 = 21,1$; $p < 0,001$).

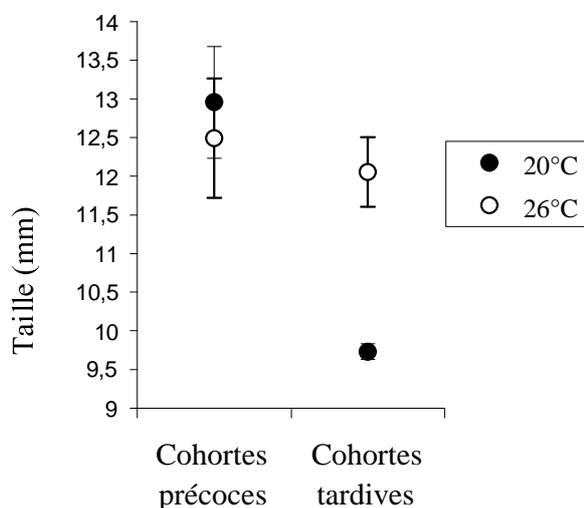


Figure 4 : Taille moyenne du naissain par cohortes de fixation et température (« cohortes précoces », correspond à des individus fixés durant les premiers 3 jours de la période de fixation (sur 9 jours au total) ; « tardives », correspond à des individus fixés durant les derniers 3 jours).

3.3.4. Données de génotypages au stade naissain

Pour la condition 20° C, l'analyse statistique indique une différence significative (voie femelle $\chi^2 = 25,9$; $p < 0,001$, voie mâle $\chi^2 = 25,3$; $p < 0,001$) entre contributions des juvéniles issus de cohortes de fixation précoce et tardive. La condition 26° C montre également une différenciation entre cohortes (voie femelle $\chi^2 = 6,1$; $p < 0,05$, voie mâle $\chi^2 = 0,7$; $p < 0,01$). Les contributions des juvéniles issus de cohortes précoces à 20 et 26° C sont significativement différentes (voie femelle $\chi^2 = 17,2$; $p < 0,001$, voie mâle $\chi^2 = 25,5$; $p < 0,001$), même résultat pour la comparaison entre cohortes tardives (voie femelle $\chi^2 = 17,2$; $p < 0,001$, voie mâle $\chi^2 = 14,1$; $p < 0,001$).

3.4. Réponse à la sélection sur la taille en phase précoce

Du fait des différences de taille efficace mises en évidence précédemment, la parenté moyenne de la population issue d'éclosion est supérieure (près de six fois) ($r = 0,068 \pm 0,005$ contre $r = 0,012 \pm 0,001$) à celle de la population sauvage.

La distribution des fréquences de taille des larves varie nettement au cours de l'élevage larvaire en fonction de l'origine du croisement. Afin d'éviter le biais dû à un effet de densité, nous avons choisi de ne représenter

que les réplicats des conditions ExE et SxS dont les nombres de larves étaient équivalents 3 jours post-fécondation (fig. 5).

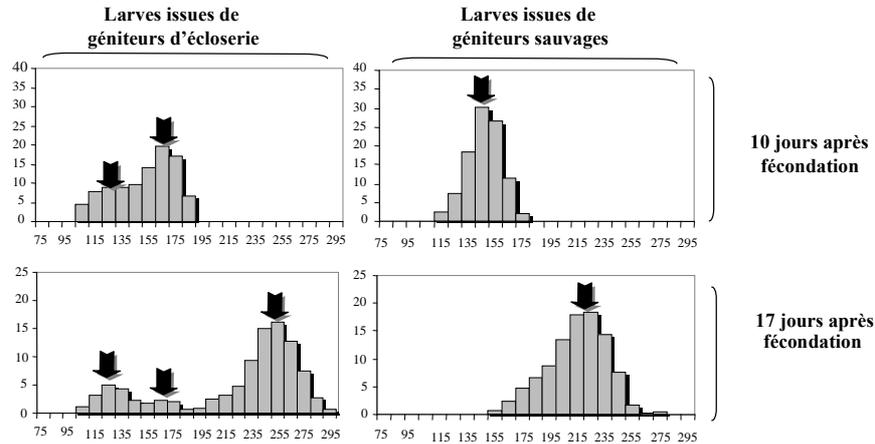


Figure 5 : Histogrammes de distribution des tailles de larves pour les descendants des croisements Écloserie x Écloserie et Sauvage x Sauvage, 10 et 17 jours post-fécondation (chaque flèche signale la présence d'un mode).

Le lot ExE tient une place particulière dans la mesure où une décomposition bimodale de la distribution de classe de taille dès le 10^e jour post-fécondation est observable. Cette bimodalité se distingue encore plus nettement par la suite. En parallèle, les larves issues des trois autres types de croisements montrent une distribution unimodale. La structure plurimodale est confirmée pour le reste des dates d'échantillonnage pour le croisement ExE. Ainsi après 17 jours d'élevage, trois modes sont observables (fig. 5).

En relation avec les distributions de fréquence de taille précédemment décrites, l'évolution temporelle des coefficients de variation sur la taille démarque le croisement ExE des trois autres.

La survie des larves issues du croisement ExE est significativement la plus faible (SxE, $F = 9,41$, $p = 0,05$; SxS, $F = 11,25$, $p = 0,028$), sauf comparée avec la survie des larves SxE. En cause, la mortalité des larves issues du mode dont la croissance est la faible, par opposition au groupe de larves à croissance plus rapide. Les larves SxS montrent le meilleur taux de survie après 20 jours, mais ne diffèrent cependant pas statistiquement des valeurs obtenues pour les descendants hybrides ($p = 0,38$ et $p = 0,72$).

Pour l'ensemble des lots, la fenêtre temporelle de fixation s'étend sur 12 jours (entre 20 et 32 jours post-fécondation). Pour le croisement ExE, 90 % des larves pédivéligères sont présentes dans les six premiers jours. Les effectifs observés après cette période restent résiduels (moins de 10 %). La dis-

tribution des effectifs pour les autres croisements est plus progressive et se rapproche d'une normale. Par ailleurs, les résultats de l'estimation globale du taux de fixation donnent les valeurs respectives suivantes : 90,7 % (ExE), 72,3 % (SxS), 78,1 % (ExS) et 68,7 (SxE).

4. DISCUSSION

4.1. Pertinence de l'approche « famille en mélange »

L'élevage des larves en mélange constitue une approche originale de la problématique. Déjà fréquemment utilisée pour certaines espèces de poisson, elle est en revanche relativement nouvelle pour les bivalves [6]. Malgré un coût initial lié aux génotypages, elle permet d'augmenter le nombre de familles étudiées (donc la puissance de l'analyse génétique) et de s'affranchir des hétérogénéités environnementales qui biaisent les estimations des effets génétiques. Grâce à seulement trois marqueurs dont la variabilité allélique est d'environ 30 allèles en populations sauvages, l'assignation de parenté offre des résultats satisfaisants. Ainsi pour l'ensemble des expériences menées, sur les 4 032 larves individualisées pour génotypage, 3 369 ont pu être assignées avec certitude à un couple de géniteurs (soit 84 %). La difficulté d'extraction d'ADN sur ce type de matériel explique les 16 % manquants. En cela, les méthodes de conservation des larves paraissent perfectibles. Malgré cela, la méthode d'extraction couplée au multiplexage permet une analyse simple et efficace pour optimiser les assignations de parenté. Concernant la capacité d'analyse de la diversité des stocks de géniteurs, ce jeu de marqueurs constitue également un outil précieux car rapide et informatif. Il existe désormais un nombre de marqueurs microsatellites suffisamment abondant ([27], [20], [24], [38], [19], [46]) pour déterminer d'autres jeux de marqueurs afin d'améliorer cette résolution, mais cela sera associé à un coût de génotypage forcément supérieur.

4.2. Conséquences pratiques des pressions de sélection en phase larvaire

Considérant dans un premier temps l'effet du tamisage, nous sommes confrontés à deux résultats (phénotypique et génétique), qui considérés l'un sans l'autre, peuvent mener à des interprétations différentes. D'un point de vue phénotypique, la sélection sur la taille a un effet plus important sur la variabilité des tailles de larves, homogénéisant ces dernières, que sur la croissance moyenne. Ceci suggère que le tamisage sélectif induisant une élimination des petites larves, est une procédure permettant un gain de temps à la fixation, aboutissant à une réduction de production relativement limitée du fait de la meilleure survie relative et du meilleur succès à la fixation des lar-

ves à croissance rapide. D'un point de vue génétique, il y a cependant un risque substantiel de perte de diversité lié à cette pratique dans le cadre de programmes de sélection massale. Laing et Earl [23] avaient déjà souligné l'importance des cohortes tardives dans le but de minimiser les effets de dérive génétique dans les stocks d'écloserie et ainsi proposé le maintien de l'ensemble de la population larvaire pour la production de naissain. Nos données confirment leurs hypothèses. Le maintien de ces cohortes tardives pourrait être important car il permettrait de minimiser la variabilité du succès reproducteur et de fait, de maximiser la variabilité génétique des lots résultants.

Ces résultats font écho aux estimations de variabilité sur les stocks d'écloseries commerciales où l'on peut constater (sauf exception, écloserie D) une diversité allélique inférieure à celle des populations témoins échantillonnées en milieu naturel. A noter que pour la population de l'écloserie B, 99 % des individus sont observés comme hétérozygotes. Ces données semblent nous renseigner sur le mode de gestion du stock et sont vraisemblablement le résultat d'une procédure de sélection en population semi-fermée. On peut aussi légitimement penser qu'il s'agit d'une population ayant subi un goulot d'étranglement (suivi d'un croisement avec des individus d'une population sauvage), expliqué par le fait que la diversité allélique diminue plus vite que l'hétérozygotie après un tel événement [28].

Ces éléments renvoient également à la troisième expérience menée, révélant l'expression supposée d'un fardeau génétique en phase larvaire au travers de la sous-population (ExE) de larves à croissance lente dont la survie est quasi-nulle en fin d'élevage. Les effets négatifs de croisements entre apparentés (dépression de consanguinité) sont présumés, non plus cette fois dans des croisements expérimentaux visant à générer de la consanguinité [5], [22], mais dans un cadre concret d'une population d'écloserie commerciale. L'effet positif de la sélection sur la taille (meilleur succès à la métamorphose de la sous-population à croissance rapide issue du croisement ExE) s'oppose à l'expression présumée du fardeau génétique. Par ailleurs, le bénéfice apparent de la sélection des larves à croissance rapide peut aussi être discuté. Différentes études rapportent une corrélation positive entre caractères au stade larvaire (croissance le plus souvent) et post-larvaire permettant d'envisager positivement une pratique de tamisage (*C. gigas* : [9], *C. virginica* : [31], [15], [26]). Newkirk et Haley [32] et Newkirk [30] discutent cependant le fait que cet avantage en phase précoce de développement tend à disparaître avec le temps, même si ce dernier peut se retrouver dans les premiers mois après métamorphose. De plus, l'existence d'une corrélation génétique négative entre croissance larvaire et succès à la métamorphose [12], ne plaide pas en faveur d'un tamisage sélectif en sélection.

Production de larves d'huîtres en éclosion

L'influence de la température, au travers d'une expression plus précoce (en condition chaude, 26 °C) de la variabilité génétique sur un caractère comme la croissance, doit également être prise en compte. La variabilité génétique pour la croissance larvaire s'exprimant précocement à 26 °C (température proche de celles appliquées en conditions contrôlées d'éclosion), l'effet du tamisage au cours du développement larvaire est d'autant plus significatif sur la perte de diversité.

On peut conclure que le tamisage sélectif ne semble pas trouver de véritable appui en terme de pratique systématique, en tout cas du point de vue de la diversité génétique. Car il est aussi évident que l'élimination des « queues de lot » peut, dans un contexte sanitaire, être utile de façon à éviter le développement d'éléments pathogènes ou une dégradation du milieu d'élevage liés à la décomposition des larves mortes. Il reste à déterminer la limite entre un tamisage « trop sélectif » pour la diversité génétique des stocks et un tamisage préservant cette diversité et permettant aux éclosiers de réaliser un élevage dans des délais compatibles avec les contraintes économiques et/ou zoosanitaires de production.

Considérant l'effet de la température, il semble plus difficile de tirer des conclusions claires. Nous avons vu que la variabilité génétique pour la taille est exprimée plus précocement durant l'élevage des bacs maintenus à 26 °C. Cette température est, comme montré à de nombreuses reprises, favorable à un développement larvaire optimal de l'espèce. Ainsi, les taux de survie et de fixation à 20 °C sont nettement plus faibles. De surcroît, la température en phase larvaire interagit avec la croissance des juvéniles et l'hypothèse d'une corrélation positive entre croissance larvaire et juvénile est partiellement soutenue puisque uniquement démontrée à 20 °C. C'est incontestablement en association avec une pratique de tamisage sélectif que l'influence de la température est intéressante tant celle-ci permet une expression supérieure de la variabilité.

5. CONCLUSION

Ces travaux apportent des éclaircissements sur les processus sélectifs appliqués en éclosion. Il apparaît de façon assez claire que les conséquences des pressions de sélection que nous avons envisagées sont importantes en terme de gestion de la variabilité. Des études supplémentaires seraient nécessaires afin de définir un ratio optimal d'élimination, qui à la fois pourrait minimiser la perte relative de naissain et maximiser la réduction de variabilité dans la fenêtre temporelle de fixation. La répétabilité de certains résultats reste à examiner.

La partie concernant une réponse à la sélection mérite aussi d'être approfondie avec la mise en place de protocole incluant des points d'échantillonnage plus tardifs dans le temps, comme par exemple 1 an après métamorphose de façon à confirmer l'avantage sélectif sur la croissance.

Les résultats obtenus dans ce contexte très particulier de domestication pourraient également être confirmés et développés, suivant cette fois une approche plus fondamentale de génétique quantitative, focalisée entre autre sur les bases génétiques (et leur plasticité) de caractères larvaires d'intérêt. L'approche famille en mélange doit permettre de considérer ces éléments dans un contexte environnemental « standard ».

De façon plus générale, il serait important d'envisager un effort supplémentaire sur le développement de nouveaux jeux de marqueurs. Le jeu de trois marqueurs ici utilisé est un outil intéressant qui pourrait aisément être complété compte tenu de la centaine de marqueurs aujourd'hui disponibles. Leur intérêt tiendrait notamment dans la possibilité de choisir au mieux les géniteurs à l'origine de nouveaux stocks en minimisant leur apparentement. Cela fait écho au concept de « parenté minimale » (« minimal kinship ») envisagé pour les élevages de poissons par de nombreux auteurs [2], [11], [40], [36], [39] et utilisé par les sélectionneurs piscicoles français depuis 1997 [16]. Le principe est de déterminer et de privilégier les individus présentant une « parenté » minimale, minimisant l'effet de dérive et de consanguinité. Cette approche repose sur le calcul des coefficients du type de ceux employés dans la troisième expérience.

Enfin, l'approche famille en mélange, qui dans ce projet a été focalisée sur le stade larvaire, pourrait cette fois-ci être mise en oeuvre pour d'autres stades. Elle constituerait une « première » chez *C. gigas*, permettant de compléter les données issues des approches plus classiques d'élevage en familles séparées [10]. La faisabilité de cette démarche reste à démontrer chez les bivalves. A quel point le fort déséquilibre de contribution parentale est-il le plus faible pour envisager de mélanger les familles sans déséquilibrer cette répartition une fois les huîtres placées sur les parcs d'élevage ? Nous avons vu que l'espèce est caractérisée par une forte variance du succès reproducteur, associée à la possibilité d'expression du fardeau génétique. Le maintien d'un niveau important de diversité génétique afin de minimiser les effets de consanguinité, est essentiel pour une gestion durable et efficace des stocks d'huîtres d'écloserie.

REMERCIEMENTS

Cette étude s'inscrit dans le cadre du projet ECLOGIGAS, appel à proposition 2003-2004 du Bureau des Ressources Génétiques, convention de

recherche n° 14-C/2003 du Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable. L'ensemble du travail a été effectué au sein du laboratoire Génétique-Pathologie IFREMER La Tremblade, en ce sens, nous souhaitons remercier l'ensemble de l'équipe technique. Nous remercions également l'ensemble des écloséries françaises pour avoir fourni les lots étudiés.

RÉFÉRENCES

- [1] Aldana-Aranda D., Baqueiro C., Suarez V.P., Overview of temperatures used in larviculture of *Strombus* spp., Proceedings Gulf and Caribbean Fisheries Institute 52 (2001) 327-339.
- [2] Ballou J.D., Lacy R.C., Identifying genetically important individuals for management of genetic variation in pedigreed population, In: Ballou, J.D., Gilpin, M., Foose, T.J. (Eds.), Population Management for Survival and Recovery. Columbia Univ. Press, New York, 1995, pp. 76-111.
- [3] Belkhir K., Borsa P., Chikhi L., Raufaste N., Bonhomme F., GENETIX 4.05, logiciel sous Windows™ pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier (France), 1996-2004.
- [4] Bhattacharya C.G., A simple method of resolution of a distribution into Gaussian components, Biometrics 23 (1967) 115-135.
- [5] Bierne N., Launey S., Naciri-Graven Y., Bonhomme F., Early effect of inbreeding as revealed by microsatellite analyses on *Ostrea edulis* larvae, Genetics 148 (1998) 1893-1906.
- [6] Boudry P., Collet B., Cornette F., Hervouet V., Bonhomme F., High variance in reproductive success of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*, Thunberg) revealed by microsatellite-based parentage analysis of multifactorial crosses, Aquaculture 204 (2002) 283-296.
- [7] Brookfield J.F.Y., A simple new method for estimating null alleles frequency from heterozygote deficiency, Mol. Ecol. 5 (1996) 453-455.
- [8] Chakraborty R., De Andrade M., Daiger S.P., Budowle B., Apparent heterozygote deficiencies observed in DNA typing data and their implications in forensic applications, Ann. Hum. Genet. 56 (1992) 45-57.
- [9] Collet B., Boudry P., Thebault P., Heurtebise S., Morand B., Gérard A., Relationship between pre- and post settlement growth in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg), Aquaculture 175 (1999) 215-226.
- [10] Dégremont L., Etude des bases génétiques de la mortalité estivale et des relations avec la croissance chez les juvéniles de l'huître creuse *Crassostrea gigas*, Thèse de Doctorat de l'Université de Caen, 2003, 333 p.
- [11] Doyle R.W., Perez-Enriquez R., Takagi M., Taniguchi N., Selective recovery of flounder genetic diversity in aquacultural broodstocks and captive, endangered fish populations, Genetica 111 (2001) 291-304.
- [12] Ernande B., Clobert J., McCombie H., Boudry P., Genetic polymorphism and trade-offs in the early life-history strategy of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1795): A quantitative genetics study, J. Evolution. Biol. 16 (2003) 399-414.

- [13] FAO, Aquaculture production : quantities 1950-2003 Fishstat Plus, 2005. <http://www.fao.org/fi/statist/FISOFT/FISHPLUS.asp>
- [14] FiSAT (FAO-ICLARM Stock Assessment Tools). Gayanilo F.C.Jr., Sparee P., Pauly D., Food and Agriculture Organization of the united nations, Rome, 2002. <http://www.fao.org/fi/statist/fisoft/fisat/downloads.htm>
- [15] Haley L.E., Newkirk G.F., Selecting oysters for faster growth, Proceedings of the World Mariculture Society 8 (1978) 557-564.
- [16] Haffray P., Pincet C., Rault P., Coudurier B., 2004. Domestication et amélioration génétique des cheptels piscicoles français dans le cadre du SYSAAF. INRA Prod. Anim. 17(3): 243-252.
- [17] Hasselblad V., Estimation of parameters for a mixture of normal distributions, Technometrics 8 (1966) 431-444.
- [18] Herlinger C.M., O'Reilly P.T., Doyle R.W., Wright J.M., O'Flynn F., Early growth performance of Atlantic salmon full-sib reared families reared in single family tanks *versus* in mixed family tanks, Aquaculture 173 (1999) 105-116.
- [19] Hubert S., Hedgecock D., Linkage maps of microsatellite DNA markers for the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, Genetics 168 (2004) 351-362.
- [20] Huvet A., Boudry P., Ohresser M., Delsert C., Bonhomme F., Variable microsatellites in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and the other cupped oyster species, Anim. Genet. 31 (2000) 71-72.
- [21] Laing I., Earl N.H., The lipid content, spatfall and subsequent growth of early and late settling hatchery-reared Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg larvae, Aquac. Res. 29 (1998) 19-25.
- [22] Launey S., Hedgecock D., High genetic load in the pacific oyster *Crassostrea gigas*, Genetics 159 (2001) 255-262.
- [23] Le Roux S., Un marché très demandeur sur le naissain d'écloserie, L'Ostréiculteur français 174 (2004).
- [24] Li G., Hubert S., Bucklin K., Ribes V., Hedgecock D., Characterization of 79 microsatellite DNA markers in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, Mol. Ecol. Notes 3 (2003) 228-232.
- [25] Littell R.C., Milliken G.A., Stroup W.W., Wolfinger R.D., SAS system for mixed models, SAS Inst., Cary, NC, 1996.
- [26] Losee E., Relationship between larval and spat growth rates in the oyster (*Crassostrea virginica*), Aquaculture 16 (1979) 123-126.
- [27] Magoulas A., Gjetvaj B., Terzoglou V., Zouros E., Three polymorphic microsatellites in the Japanese oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg), Anim. Genet. 29 (1998) 69-70.
- [28] Nei M., Maruyama T., Chakraborty, The bottleneck effect and genetic variability in populations, Evolution 29 (1975) 1-10.
- [29] Nei M., Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press, New York, 1987.
- [30] Newkirk G.F., On the unpredictability of bivalve growth rates: is a slow growing juvenile oyster a runt for life?, in : Claus, C. *et al.* (Ed.). Nursery Culturing of Bivalve Molluscs: Proceedings of the International Workshop on Nursery Culturing of Bivalve Molluscs Ghent, Belgium, 24-26 February 1981, European Mariculture Society Special Publication 7 (1981) 211-218.

Production de larves d'huîtres en éclosion

- [31] Newkirk G.F., Haley L.E., Waugh D.L., Doyle R., Genetics of larvae and spat growth rate in the oyster *Crassostrea virginica*, Mar. Biol. 41 (1977) 49-52.
- [32] Newkirk G.F., Haley L.E., Phenotypic analysis of the European oyster *Ostrea edulis* L.: relationship between length of larval period and postsetting growth rate, J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 59 (1982) 177-184.
- [33] Ritland K., Estimators for pairwise relatedness and individual inbreeding coefficients, Genet. Res. 67 (1996) 175-185.
- [34] Robertson A., Inbreeding in artificial selection programmes, Genet. Res. 2 (1961) 189-194.
- [35] Rumrill S.S., Natural mortality of marine invertebrate larvae, Ophelia 32 (1990) 163-198.
- [36] Russello M.A., Amato G., *Ex situ* population management in the absence of pedigree information, Mol. Ecol. 13 (2004) 2829-2840.
- [37] SAS Institute Inc., SAS/STAT User's Guide, Version 8, vol. 2. SAS Institute Inc., Cary, NC, 1999.
- [38] Sekino M., Hamaguchi M., Aranishi F., Okoshi K., Development of novel microsatellite DNA markers from the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, Mar. Biotech. 5 (2003) 227-233.
- [39] Sekino M., Sugaya T., Hara M., Taniguchi N., Relatedness inferred from microsatellite genotypes as a tool for broodstock management of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*, Aquaculture 233 (2004) 163-172.
- [40] Taniguchi N., Genetic factors in broodstock management for seed production, Reviews in Fish Biology and Fisheries, 13 (2003) 177-185.
- [41] Taris N., Baron S., Sharbel T.F., Sauvage C., Boudry P., A combined microsatellite multiplexing and boiling DNA extraction method for high throughput parentage analyses in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*), Aquac. Res. 36 (2005) 1-3.
- [42] Thorson G., Reproductive and larval ecology of marine bottom invertebrates, Biol. Rev. 25 (1950) 1-45.
- [43] Vandeputte M., Launey S., Quelle gestion génétique de la domestication chez les poissons? INRA Productions Animales 17 (2004) 237-242.
- [44] Weir B.S., Cockerham C.C., Estimating F-statistics for analysis of population structure, Evolution 38 (1984) 1358-1370.
- [45] Widdows J., Physiological ecology of mussel larvae, Aquaculture 94 (1991) 147-163.
- [46] Yamtich J., Voigt M.-L., Li G., Hedgecock D., Eight microsatellite loci for the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, Anim. Genet. 36 (2005) 524-526.