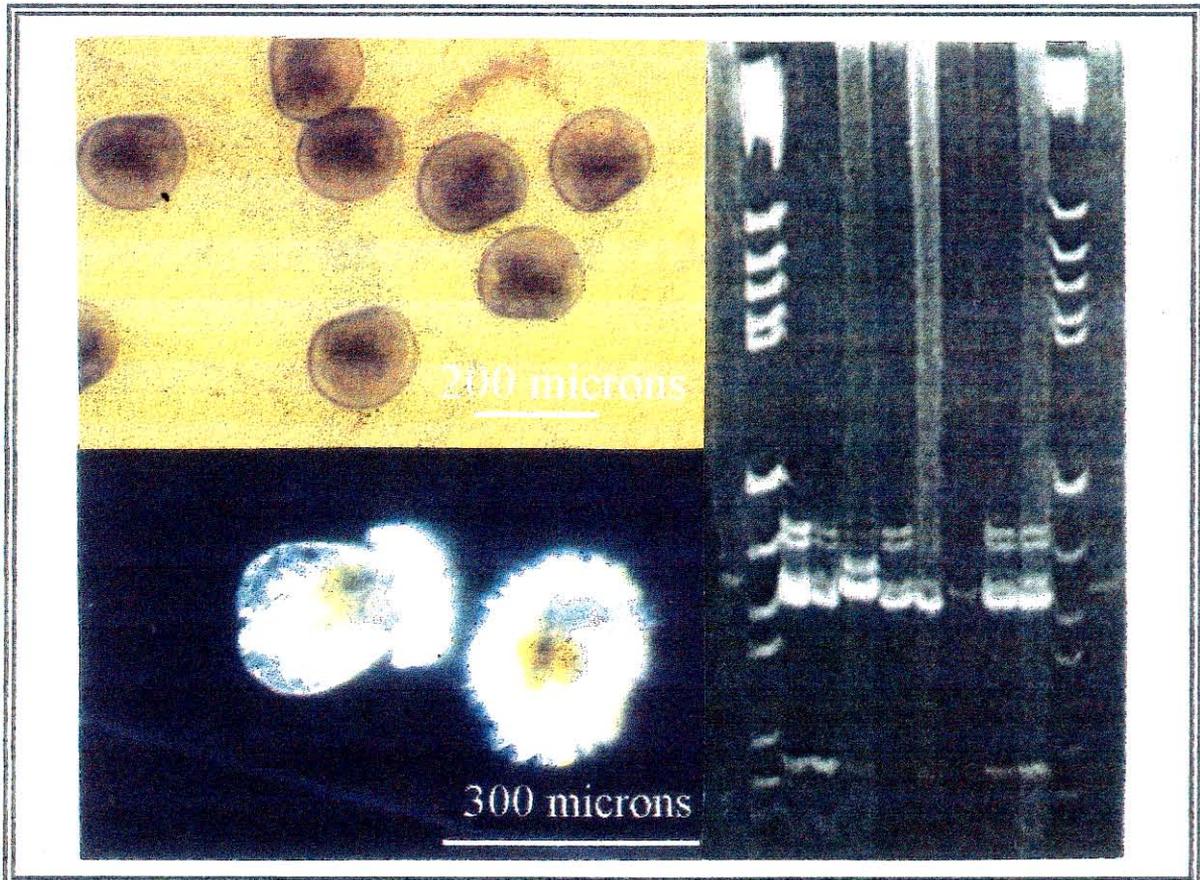


ECOLE POLYTECHNIQUE, PROMOTION X 92

Frédéric LE CLERC

Evolution de la relation hétérozygotie-croissance et du déficit en hétérozygotes dans une population synthétique d'*Ostrea edulis*



Option : Biologie et Ecologie

Département de Biologie

Directeur de l'option : Sylvain BLANQUET

Organisme d'accueil : IFREMER, Ronces les Bains, BP 133, 17390, La Tremblade

Directeur de stage : Yamama NACIRI

Dates du stage : 18 Avril-14 Juillet 1995

The IFREMER logo, featuring a stylized blue and white graphic of a fish or wave above the word 'IFREMER' in bold, blue, sans-serif capital letters.

REMERCIEMENTS

Je tiens à adresser mes plus sincères remerciements à Monsieur Henri Grizel, qui a bien voulu me recevoir au sein de ce laboratoire d'IFREMER.

Je remercie tout particulièrement Monsieur André Gérard, responsable de l'Unité de Recherche en génétique pour son accueil chaleureux.

Ma plus vive gratitude va à mon maître de stage, Mademoiselle Yamama Naciri dont les compétences et l'efficacité n'ont d'égal que la gentillesse, et qui a apporté à ce rapport une contribution fondamentale.

Je remercie également toute l'équipe de l'URGE, Christophe Ledu dont l'aide fut aussi précieuse qu'agréable, Pierre Boudry, qui a su m'aider à analyser des résultats parfois peu encourageants, Sophie Launey, Pascal Phélipot, Serge Heurtebise et Emile Planche.

Je remercie enfin toute l'équipe de l'URPIG (Unité de Recherche en Pathologie et Immunologie Générales), dont la disponibilité à toute épreuve m'a permis de résoudre de nombreux problèmes, ainsi que tous les autres membres de ce laboratoire.

Evolution de la relation hétérozygotie-croissance et du déficit en hétérozygotes dans une population synthétique d'*Ostrea edulis*

FREDERIC LE CLERC

Elève à l'Ecole Polytechnique, stage d'option

La production nationale d'huîtres plates *Ostrea edulis*, forte de 20 000 tonnes dans les années 1970 est aujourd'hui de l'ordre du millier de tonnes. Deux épidémies de protozoaires parasites ont provoqué cette chute spectaculaire. La première est due à *Marteilia refrigens* qui, au début des années 70, a réduit la production en cantonnant l'élevage de l'huître plate aux eaux profondes. La seconde, due à *Bonamia ostreae* au début des années 80, a cette fois attaqué les élevages en eau profonde, provoquant l'arrêt quasi total de la production. En 1992, la production était de 1800 tonnes, et s'effectuait exclusivement en Bretagne, dans des élevages à densité très faible, parfois mixtes avec des huîtres creuses *Crassostrea gigas*, et avec des cycles d'élevage raccourcis, *Bonamia* semblant se développer préférentiellement lors de la deuxième année de reproduction.

Devant l'importance scientifique et commerciale que représente l'étude de tels phénomènes, certains laboratoires, comme l'Unité de Recherche en Génétique (URGE) du laboratoire d'IFREMER à La Tremblade, y consacrent leurs efforts depuis une dizaine d'années. Les principaux objectifs de l'URGE visent essentiellement à développer des programmes sur les mollusques bivalves, dans le domaine de la génétique quantitative, de la cytogénétique, de l'acclimatation et de l'hybridation. Les objectifs affichés sont l'obtention de lignées ou de souches présentant des caractères de résistance aux maladies parasitaires et/ou de meilleures performances de croissance et de qualité de chair.

Introduction

1. Le programme de sélection

Dans le cadre du projet de relance de la production de l'huître plate en France, mené par l'IFREMER et soutenu par les régions Bretagne et Poitou-Charentes, un programme de sélection de souches d'huîtres plates *Ostrea edulis* résistantes ou tolérantes à *Bonamia ostreae* a été engagé à partir de 1985.

Deux populations ont ainsi été sélectionnées; elles présentent un avantage de résistance certain sur les témoins du milieu naturel. Les résultats obtenus ont montré qu'en terme de résistance, les croisements entre les deux lignées sélectionnées présentent un avantage hautement significatif sur les témoins, et que leur croissance est également améliorée.

2. Les marqueurs génétiques

La recherche de marqueurs génétiques neutres hypervariables (*microsatellites*) a débuté dans le cadre de l'appel d'offre IFREMER-Biotechnologies 94. Ces marqueurs sont de bons traceurs en généalogie et permettent de rassembler des familles différentes dans une même structure avec identification *a posteriori*. On peut également envisager leur utilisation comme marqueurs de caractères ou comme aide à la sélection.

Les techniques d'obtention de microsatellites sur un modèle mollusque (*Ostrea edulis*) et leur identification ont été mises au point par Yamama Naciri (URGE IFREMER La Tremblade) en association avec le laboratoire "Génome et Populations" de l'Université de Montpellier II. Ce travail a été poursuivi par Yves Vigouroux (DEA Evolution et Ecologie, "Relation hétérozygotie-croissance chez l'huître plate *Ostrea edulis*. Marqueurs protéiques et microsatellites."). L'ensemble de ces travaux s'est traduit, un an après leur initiation, par le clonage, le criblage, et le séquençage d'une dizaine de marqueurs microsatellites dont quatre peuvent être utilisés en routine (Naciri *et al.*, 1995). Ces résultats ont également apporté un nouvel éclairage sur la relation hétérozygotie-croissance chez les bivalves.

3. Relation hétérozygotie-croissance et déficits en hétérozygotes

De nombreuses études montrent, chez les bivalves marins, une corrélation entre hétérozygotie aux locus enzymatiques et croissance (moules : Koehn et Gaffney, 1984; Singh et Zouros, 1981; palourdes : Koehn *et al.*, 1988). Cette corrélation est aussi observée chez quelques vertébrés (truites : Liskauskas et Fergusson, 1990) et chez des conifères (Ledig *et al.*, 1987). Dans certains cas cependant, une absence de relation a été relevée (palourdes : Diehl et Koehn, 1985; pectens : Zouros et Foltz, 1987; Vockaert et Zouros, 1989; autres mollusques : Booth *et al.*, 1990). Ces résultats divergents peuvent s'expliquer par la diversité des stades analysés (des post-larves aux adultes). En effet, la plupart de ces études portent plutôt sur la relation hétérozygotie-poids à un âge donné au sein d'une même cohorte (donc supposée d'âge homogène) et sur des individus suffisamment gros pour permettre l'utilisation de marqueurs enzymatiques. L'existence de phénomènes de compensation (plus fort taux de croissance des individus de plus petite taille) souligne la nécessité d'avoir accès à la croissance, et donc à un suivi individuel minimal pour pouvoir analyser correctement l'influence de l'hétérozygotie (David *et al.*, 1995). La récente mise au point de marqueurs microsatellites sur l'huître plate *Ostrea edulis* devrait désormais permettre d'étudier une population dès ses stades les plus précoces et de suivre son évolution au cours du temps.

Différentes hypothèses ont été avancées pour expliquer la relation entre hétérozygotie et croissance.

- Contrairement à l'opinion communément admise il y a 20 ans, il s'avère que les enzymes ne sont pas aussi neutres qu'on aurait pu le croire (Congdon, 1994; Hughes *et al.*, 1995). Certains allèles de systèmes enzymatiques se sont en effet révélés être sélectionnés dans certaines conditions de milieu. La neutralité des enzymes ainsi remise en cause, deux hypothèses peuvent alors être proposées : celle de *superdominance directe* des locus enzymatiques, qui accorde un avantage sélectif aux hétérozygotes (Koehn *et al.*, 1988), la relation observée découlant alors directement des enzymes étudiées, et celle de *superdominance associative*, où les locus enzymatiques ne seraient que des marqueurs de l'hétérozygotie globale du génome (Zouros et Foltz, 1987), la relation observée étant due à un effet d'hétérosis global.
- La perte de chromosomes (aneuploïdie) est un phénomène communément observé chez les bivalves marins (Thiriou-Quivrioux *et al.*, 1988). En conséquence, certains locus se retrouvent à l'état hémizygotique et sont détectés comme homozygotes. La synthèse de certains produits d'expression est ainsi divisée par deux, si des effets de compensation ne se mettent pas en place. Certains locus portant des allèles délétères peuvent réduire la compétitivité des individus.
- La présence d'allèles nuls (non détectés), allèles plus ou moins délétères à l'état hétérozygote (Foltz, 1986) a été proposée. Certains individus seraient alors comptabilisés comme homozygotes avec des performances de croissance faibles. La présence d'allèles nuls à des proportions appréciables a été détectée pour les bivalves (Gaffney, 1994).

L'utilisation de marqueurs nucléaires a priori neutres comme les microsatellites peut permettre de trancher en faveur de l'une ou l'autre des deux premières hypothèses en évaluant l'implication directe des locus enzymatiques dans la croissance. Zouros et Pogson (1994) ont adopté une telle approche. Leurs résultats, sur *Placopecten*, semblent montrer que la relation hétérozygotie-croissance serait due aux locus enzymatiques eux-mêmes. Chez *Ostrea edulis*, une étude, menée par Yves Vigouroux (Vigouroux, 1994) tend à montrer l'existence d'une relation positive entre le poids final et l'hétérozygotie dans les conditions naturelles, ce qui est conforme aux observations déjà réalisées chez *Ostrea edulis* (Jaziri, 1990). De plus, au vu des résultats comparés entre les locus enzymatiques (5) et les locus microsatellites (2), l'hypothèse de superdominance directe aux locus enzymatiques semble être la meilleure, les marqueurs anonymes enlevant de la significativité à la relation positive hétérozygotie-

croissance. Ces conclusions demandent cependant à être confirmées par des mesures sur un plus grand nombre d'individus et de locus microsattellites mais sont conformes à celles tirées par Zouros et Pogson (1994).

Cette relation positive, chez les bivalves marins, entre le nombre de locus enzymatiques hétérozygotes et la croissance est d'autant plus intéressante qu'elle est fréquemment associée à des déficits en hétérozygotes importants (Zouros et Foltz, 1987, Borsa *et al.*, 1991; Faithbrother & Beaumont, 1993). Par ailleurs, les locus qui jouent le plus dans la relation hétérozygotie-croissance sont souvent ceux qui présentent les déficits les plus forts, au moins au stade jeune (Gaffney, 1990).

Différentes hypothèses ont été là aussi avancées.

- Ces déficits étant plus importants au stade jeune et tendant à disparaître pour des populations âgées, certains auteurs ont formulé l'hypothèse d'une sélection différentielle contre les hétérozygotes avant la fixation des larves (Blanc et Bonhomme, 1986). Le retour à l'équilibre pourrait s'expliquer par une moindre viabilité des génotypes homozygotes et par l'influence de la relation hétérozygotie croissance qui permet de comptabiliser des individus jeunes et hétérozygotes comme étant des individus âgés. Aucune mise en évidence d'un tel phénomène n'est actuellement disponible.
- Un effet Walhund peut également expliquer un tel déficit. En effet, une structuration de population (par exemple, coexistence de 2 populations produisant des larves à 1 mois d'intervalle) peut échapper à un échantillonnage fait dans le milieu naturel.
- L'autofécondation et la consanguinité peuvent également créer une situation similaire. L'autofécondation est théoriquement possible chez *Ostrea edulis*. Une descendance issue d'autofécondation a été observée au laboratoire (Y. Naciri, com. pers.).
- La présence d'allèles nuls (aux locus enzymatiques) est aussi une explication possible.

L'hypothèse de sélection différentielle n'a pas pu être testée faute de marqueurs génétiques pouvant être mis en oeuvre au stade larvaire. La récente mise au point de marqueurs microsattellites sur l'huître plate *Ostrea edulis* permet désormais de tenter de répondre à cette question.

Bien que la littérature les associe souvent, il nous semble important de dissocier, dans une certaine mesure, le problème du déficit en hétérozygotes de celui de la relation hétérozygotie-croissance. Les explications des deux phénomènes peuvent être très différents même si la présence d'allèles nuls permet de répondre au deux à la fois.

4. But du stage

Ce stage prend place au début d'une étude sur des populations synthétiques de larves d'*Ostrea edulis*. La constitution d'une population de larves à partir du croisement d'une cinquantaine d'individus parentaux, puis l'échantillonnage, à différents stades, d'une fraction représentative de cette population (200 larves à chaque fois) pour des mesures individuelles et une analyse microsattellite de chaque larve comporte un grand nombre d'intérêts :

- 1) Le suivi du déficit en hétérozygotes dans la population, en relation avec les points précédents, apportera des éléments pour la compréhension des données génétiques observées en populations naturelles.
- 2) Le suivi dans le temps de la relation hétérozygotie-croissance au sein d'une même population (à l'aide des microsattellites) devrait permettre de clarifier la réalité pour chaque catégorie de marqueur, et de séparer relation hétérozygotie-croissance et relation hétérozygotie-poids en cas de phénomènes de compensation. Cependant, la durée du stage ne permettra pas l'utilisation de marqueurs enzymatiques, car les individus n'auront pas atteint une taille suffisante.
- 3) L'étude des fréquences alléliques dans la population devrait permettre à terme de déterminer la contribution respective de chaque individu parental et le nombre total de reproducteurs efficaces. Le grand nombre d'allèles observé pour certains locus microsattellites devrait permettre de déterminer avec certitude les parents de chaque individu de la population. La possibilité d'autofécondation (*Ostrea edulis* étant hermaphrodite) pourra également être examinée.

Matériels et méthodes

1. Caractéristiques de l'huître plate *Ostrea edulis*

La distribution géographique de l'huître plate *Ostrea edulis*, bivalve marin de la famille des *Ostreidae*, couvre l'Atlantique ouest et la Méditerranée : elle s'étend de la mer Noire et du littoral sud marocain au Nord de la Norvège. C'est une espèce hermaphrodite asynchrone consécutive, souvent décrite comme protandrique (d'abord de sexe mâle puis femelle), bien qu'un chevauchement des deux cycles ne soit pas exclu. La phase larvaire dure trois semaines dont une semaine dans la cavité palléale de la femelle où la fécondation a lieu. Les deux semaines restantes, la larve véligère libre se dissémine au gré des courants. Lors de la métamorphose, les larves se fixent et atteignent l'âge adulte en 1 à 3 ans suivant les conditions du milieu. La nourriture de l'huître est constituée essentiellement de plancton filtré dans la cavité palléale.

Fig 1. Différentes espèces d'huîtres : *Ostrea edulis*, *Crassostrea virginica*, *Crassostrea rivularis* et *Crassostrea gigas*



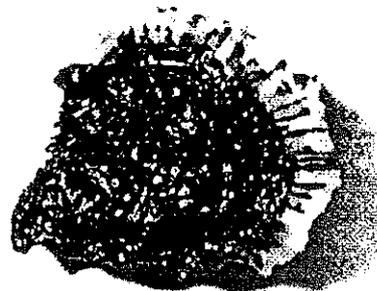
Ostrea edulis



Crassostrea virginica



Crassostrea rivularis



Crassostrea gigas

2. Géniteurs

Un échantillon d'huîtres plates vivant en eau profonde a été prélevé au large de La Rochelle fin Janvier 1995; le 3 Mars 1995, cinquante d'entre elles ont été placées dans un bac à fond nu de 100 litres pour une maturation forcée. Au cours de leur conditionnement, la température a progressivement augmenté de 10 à 16,6°C du 3 Mars au 4 Avril (1 mois). Afin de permettre la fécondation, les huîtres ont subi, les 5 et 6 Avril, un choc thermique à une température de 20°C avant d'être ramenées à 16,2°C pendant 4 jours; depuis, elles sont conditionnées à une température comprise entre 17,3 et 19,7°C. Au cours de ce conditionnement, une mortalité globale de 11 huîtres a été constatée, dont 7 avant le choc thermique. De plus, 4 huîtres ont été sacrifiées pour analyse au cours de la maturation. Sur 50 au départ, 35 sont donc actuellement en vie.

3. Pontes

A la suite du choc thermique, six pontes ont pu être observées :

Le 16 Avril, une première ponte de 1 200 000 larves d'un diamètre moyen de 197 µm a été recueillie.

Le 2 Mai, une deuxième ponte de 1 140 000 larves d'un diamètre moyen de 174 µm a été recueillie.

Le 12 Mai, une troisième ponte de 1 400 000 larves d'un diamètre moyen de 167 µm a été recueillie.

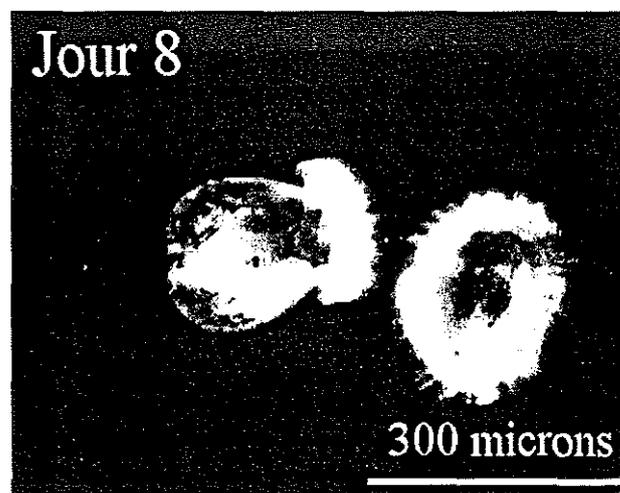
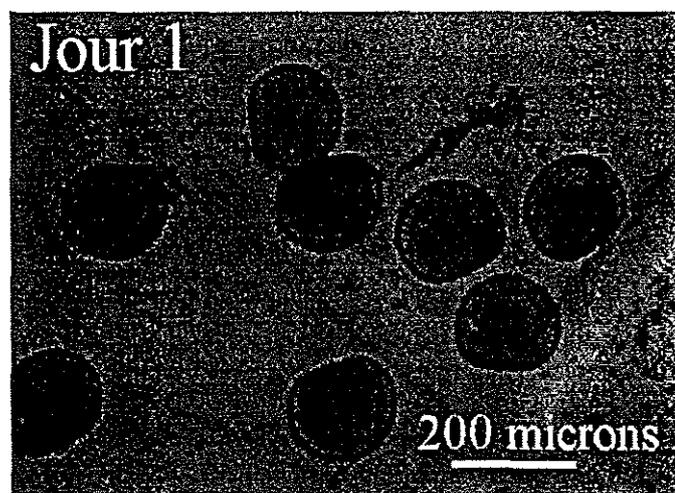
Le 14 Mai, une quatrième ponte de 1 400 000 larves d'un diamètre moyen de 185 µm a été recueillie.

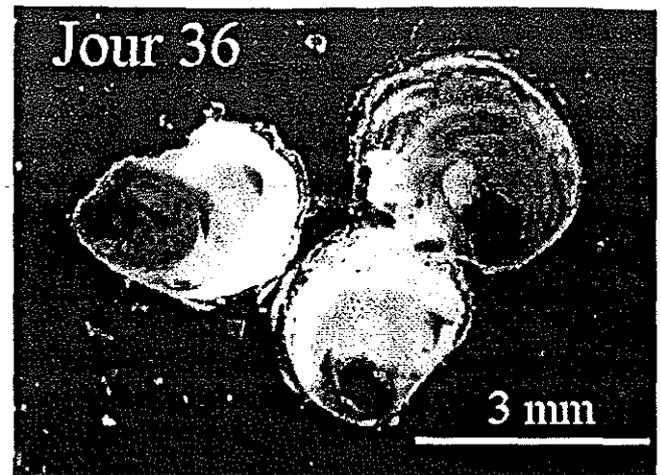
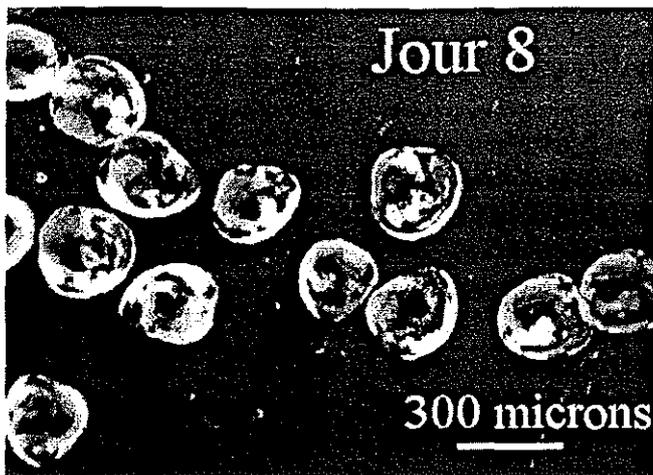
Le 16 Mai, une cinquième ponte de 4 200 000 larves d'un diamètre moyen de 162 µm a été recueillie.

Le 17 Mai, une sixième ponte de 2 800 000 larves d'un diamètre moyen de 174 µm a été recueillie.

Pour chaque ponte, un échantillon de 300 000 larves a été mis en élevage larvaire à une température de 23,2°C et l'évolution de la mortalité des larves et de leur croissance a été suivie jusqu'à la phase de fixation (Figure 2), où les huîtres sont mélangées à de la brisure de coquille afin de disposer ainsi d'un support de fixation; les mesures ne sont alors plus possibles pendant une période d'une douzaine de jours, à la suite de quoi les jeunes huîtres, qui ont alors leur apparence définitive, sont tamisées et peuvent poursuivre librement leur croissance.

Fig 2. Clichés de larves d'huîtres à un, huit, puis trente-six jours après la ponte. L'un des clichés (jour 8) montre des larves véligères vivantes en mouvement.





4. Mesures effectuées

Pour connaître le génotype des parents, les huîtres parentales ont subi une biopsie au cours de laquelle ont été prélevés des échantillons de branchies. Ces échantillons peuvent ensuite être analysés en PCR pour le polymorphisme des locus microsatellites.

Pour chaque ponte, un échantillon de 200 larves a été prélevé, chaque larve étant mesurée (on peut ainsi réaliser le profil de répartition de la taille, donc de la croissance, des larves), puis stockée individuellement en attendant l'analyse génétique.

5. Techniques employées

Les microsatellites sont des motifs répétés en tandem de 2 à 5 nucléotides qui présentent un polymorphisme de nombre de répétitions. Chez l'homme par exemple, les motifs (CA)_n sont répartis tous les 100 kb (Valdès *et al.*, 1993). Ils ont d'abord servi à fournir une carte physique du génome et ils ont depuis quelques années, été développés en génétique des populations, du fait de leur caractère *a priori* neutre et de leur utilisation facile une fois les séquences flanquantes définies (le recours à l'amplification PCR permet de travailler sur de petits échantillons, ce qui fait de ces marqueurs une technique d'analyse non destructive, ou permet de travailler sur des animaux très petits, dès le stade larvaire par exemple). De plus, le nombre élevé de ces marqueurs dans le génome permet d'obtenir des cartographies très précises des génomes étudiés, et d'espérer ainsi pouvoir trouver des corrélations entre marqueurs et caractères simples (résistance à *Bonamia*, par exemple). Le haut degré de polymorphisme attendu autorise une caractérisation très fine des individus : l'application est évidente dans les recherches de filiation.

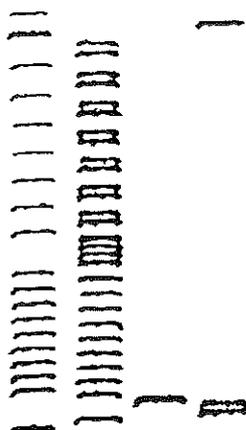


Fig 3. Exemple : séquençage du microsatellite B0; un triple, puis un double microsatellite sont visibles :

```
TATGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGGGTGTG
TGTGTGTGTGTGTGCAAGT
```

Pour identifier des microsatellites, une banque génomique partielle a été élaborée : de l'ADN a été extrait à partir d'une seule huître; il a ensuite été coupé avec des enzymes de restriction (*Alu I*, *Rsa I*, *Hae III*). Les fragments d'ADN ainsi formés ont été introduits dans un vecteur (les plasmides pBlueScript-KS et pUC 18). Des bactéries XL1-Blue ont ensuite été transformées avec ces plasmides, et celles ayant intégré le vecteur contenant de l'ADN d'huître ont été isolées et repiquées sur un milieu de culture.

A partir de la banque d'ADN ainsi réalisée, les microsatellites ont été détectés avec une sonde radioactive marquée (phosphore radioactif isotope 32) formée de répétitions $(CA)_n$ ou $(GA)_n$. Les bactéries portant des fragments d'ADN contenant ces microsatellites probables ont ainsi été isolées. L'ADN correspondant à ces microsatellites a ensuite été amplifié par multiplication des bactéries recombinantes positives, puis séquencé (Figure 3). Pour chaque séquence microsatellite identifiée, deux amorces ont été choisies dans les régions flanquantes en vue d'effectuer des amplifications par PCR, et leur température de fixation à l'ADN (température de fusion T_m) calculée (Naciri *et al.*, 1995).

Lors de l'analyse en routine des individus, une extraction d'ADN est effectuée. Deux procédés peuvent alors être utilisés, une extraction phénol-chloroforme ou une extraction au Chelex :

- L'extraction phénol-chloroforme est faite sur des quantités variables de tissus (ici $< 0,2 \text{ cm}^2$). Ces tissus sont digérés en présence de protéinase K et d'un tampon (Tris-EDTA-SDS) pendant une nuit à 55°C . L'isolement de l'ADN se fait par précipitation à l'éthanol après un lavage du mélange précédent au phénol puis au chloroforme. L'ADN est ensuite redissout dans un tampon TE (Tris-EDTA, pH8) et conservé à -20°C .
- En raison des très faibles quantités de tissus que contiennent les larves, l'utilisation de Chelex (Singer-Sam *et al.*, 1989) a été employée pour l'extraction de l'ADN. La larve est traitée avec 100 ml de Chelex 5% pendant une nuit à 56°C ; la solution est ensuite chauffée à $95-100^\circ\text{C}$ pendant 15 min, avant d'être centrifugée pendant 5 min. C'est le surnageant contenant l'ADN qui est directement récupéré pour la PCR.

L'ADN ainsi isolé est ensuite soumis à une réaction de PCR qui consiste, à partir de quantités très faibles d'ADN (de 30 à 100 ng habituellement), à amplifier de façon exponentielle de courts fragments d'ADN. Pour cela, un mélange réactif est élaboré contenant de la polymérase *Taq*, des ATP, GTP, CTP, TTP, du chlorure de magnésium, les amorces préalablement définies et l'ADN matrice. Pour que la réaction ait lieu, un cycle de température comprenant trois phases est réalisé :

- dénaturation de l'ADN à $92,5^\circ\text{C}$ (30s),
- fixation de l'amorce à la température T_m préalablement définie (30s),
- élongation par la polymérase à partir de l'amorce à 72°C (30s).

Ce cycle de température est répété trente-cinq fois, le nombre de brins amplifiés étant doublé à chaque cycle, ce qui fournit théoriquement 2^{35} brins par molécule d'ADN initialement présente. En fait, des phénomènes de saturation se produisent (baisse de la concentration en amorces, dénaturation de la polymérase, etc...), et réduisent le nombre de brins amplifiés. Cette réaction terminée, une migration sur gel d'acrylamide non dénaturant permet de visualiser les différents allèles (Figure 4).

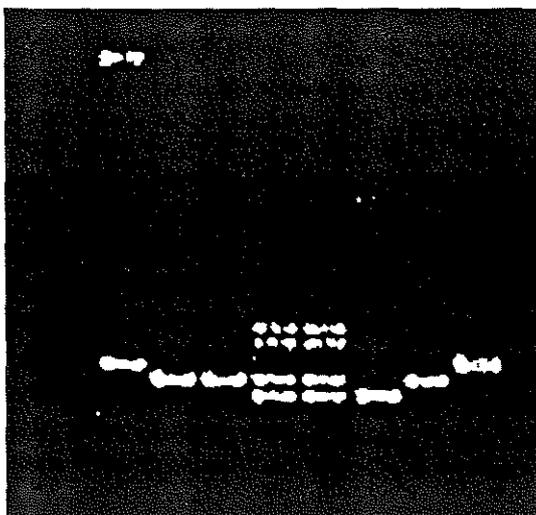


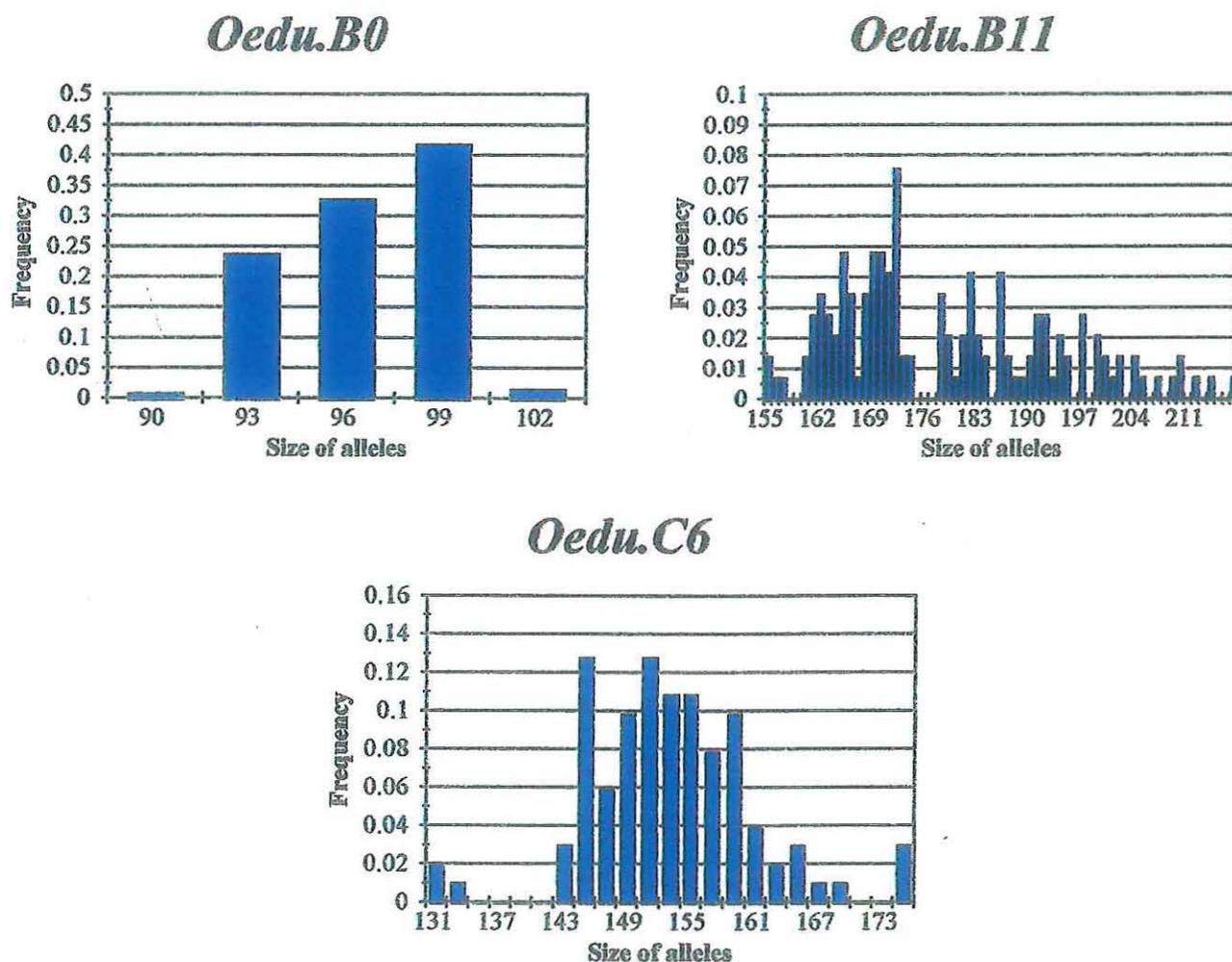
Fig 4. Exemple du locus B0 : visualisation sur gel d'acrylamide non dénaturant à 8% de quelques allèles. De gauche à droite : marqueur de taille (une bande de 100 pb et une de 200 pb), puis différents individus, dont deux sont hétérozygotes (les deux du milieu). La migration est faite à 60 V (1h30), puis 100 V (1h), et enfin 200 V (1h). Les bandes supplémentaires apparaissant chez les individus hétérozygotes sont des hétéroduplex.

Les travaux de Vigouroux (1994) et Naciri *et al.* (1995) ont permis de caractériser trois microsatellites chez *Ostrea edulis*, les locus *Oedu.B0*, *Oedu.B11* et *Oedu.C6*. Le nombre d'allèles par locus était respectivement de 5, 48 et 17. Les caractéristiques de ces locus sont détaillées dans le Tableau 1 et la répartition des allèles est présentée sur la Figure 5

Tab 1. Caractéristiques des microsatellites *Oedu.B0* (72 individus), *Oedu.B11* (73 individus) et *Oedu.C6* (51 individus) (Naciri *et al.*, 1995).

Locus Microsatellite	Motif	Amorces	Tm	Nombre d'allèles observés	Taille du plus petit allèle	Taille du plus grand allèle
<i>Oedu.B0</i>	(GGT) ₇ GGGG(GC) ₉	5'ACCTTTATACAAATCATCCCTG ^{3'} 5'ACATGACCCTTCATTTGAACC ^{3'}	55°C	5	90	102
<i>Oedu.B11</i>	(TC) ₉ (AC) ₂₂	5'TTGCATTCACTAAATATAACC ^{3'} 5'GGATTCTTACTTACCCATC ^{3'}	51°C	48	155	217
<i>Oedu.C6</i>	(TC) ₂₆	5'GTATTAATGAAAATTGGAAGG ^{3'} 5'GTCAACTCCCAACACTG ^{3'}	53°C	17	131	175

Fig 5. Répartition des allèles des microsatellites *Oedu B0*, *Oedu B11*, *Oedu C6* (Naciri *et al.*, 1995).



Les taux d'hétérozygotie moyenne théorique ($h_e = 1 - \sum x_i^2$, où x_i la fréquence du $i^{\text{ème}}$ allèle) étant pour *Oedu.B0*, *Oedu.B11* et *Oedu.C6* respectivement de 66%, 97% et 91%, avec des nombres d'allèles effectifs ($a_e = 1/\sum x_i^2$) de 2,98, 31,72 et 11,14, le choix s'est porté sur B0 en toute logique (plus fort taux d'homozygotie), puisqu'il s'agissait dans un premier temps d'étudier des rapports entre nombre d'hétérozygotes et nombre d'homozygotes. Le locus *Oedu.B0* présente l'avantage d'un petit nombre d'allèles, suffisamment distants les uns des autres en nombre de paires de bases pour pouvoir être clairement identifiés en gel d'acrylamide non dénaturant (8%, 0.75mm d'épaisseur).

Il était initialement prévu d'étendre cette étude aux autres microsatellites (*Oedu.B11* et *Oedu.C6*) mais la mise en route de la salle de radioactivité n'ayant pas pu se faire dans les délais prévus, l'utilisation de PCR radioactives, qui permettent une meilleure discrimination des bandes (différence d'une paire de base) et une lecture plus précise de leur taille a été proscrite, réduisant ainsi les techniques d'analyse microsatellite au seul locus B0.

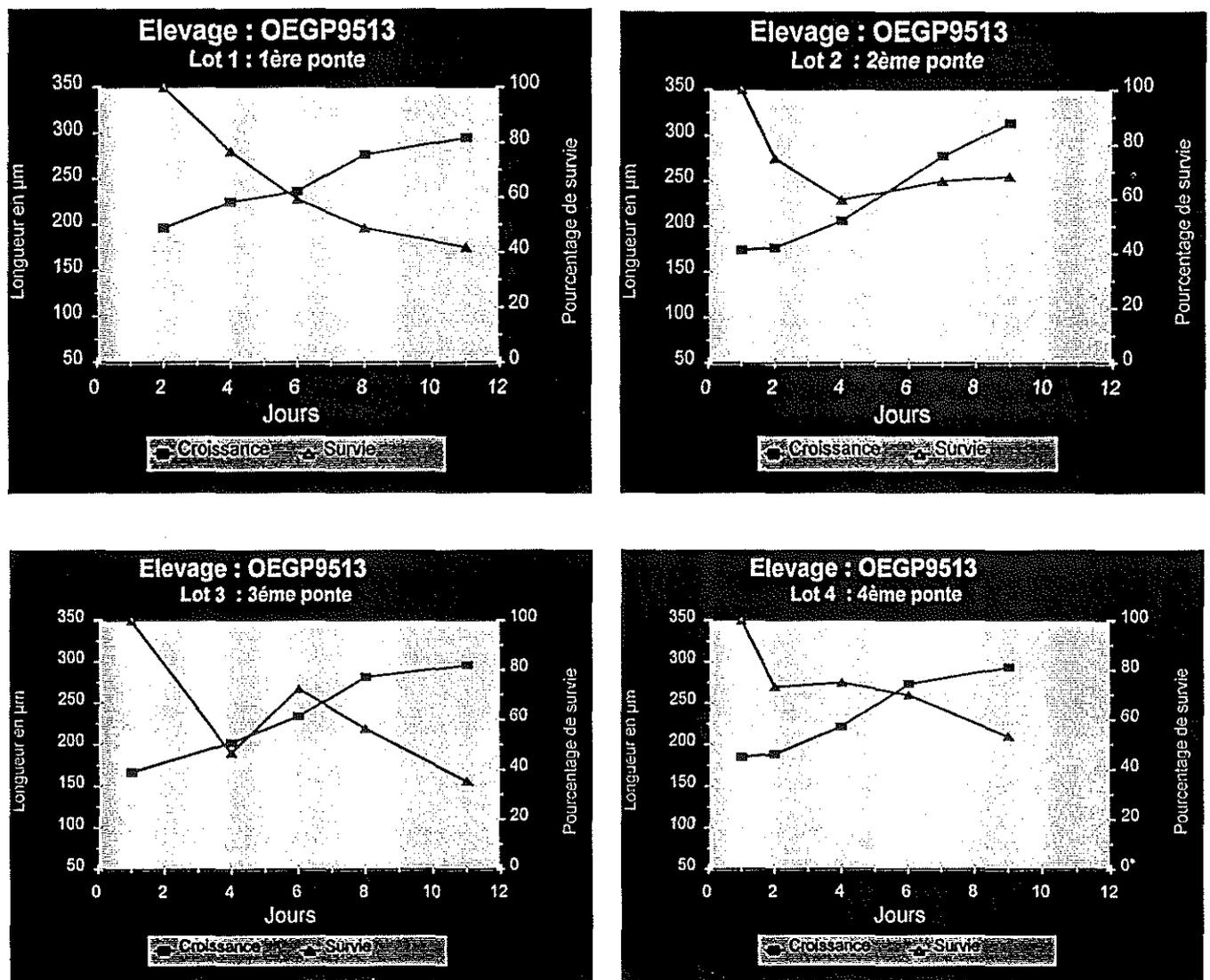
Déroulement des manipulations

I. Mesures de larves

Plusieurs séries d'échantillonnage et de mesures ont été effectués pour les six pontes successives. Toutes les pontes ont atteint la phase de fixation. Le 20 Mai cependant, l'assèchement accidentel de l'un des bacs contenant différents lots de post-larves a conduit dans un premier temps à la mort de ses occupantes. Alors que les dégâts semblaient limités, la vague de mortalité s'est étendue aux autres bacs de la salle de micronurserie. Seul le lot 3 (c'est-à-dire la 3ème ponte) a survécu et a pu donner lieu à un échantillonnage après fixation. Des mesures après fixation ont cependant pu être obtenues pour le lot 1. Pour les autres lots, seules les données avant fixation sont disponibles.

Nous présentons donc ici une série de courbes de croissance, de survie, et de profils de taille correspondant aux divers lots avant fixation (Figures 6 et 7), et quelques profils de taille pour le lot 1 (Figure 8).

Fig 6. Courbes de croissance et survie comparées des lots 1, 2, 3, 4, 5 et 6.



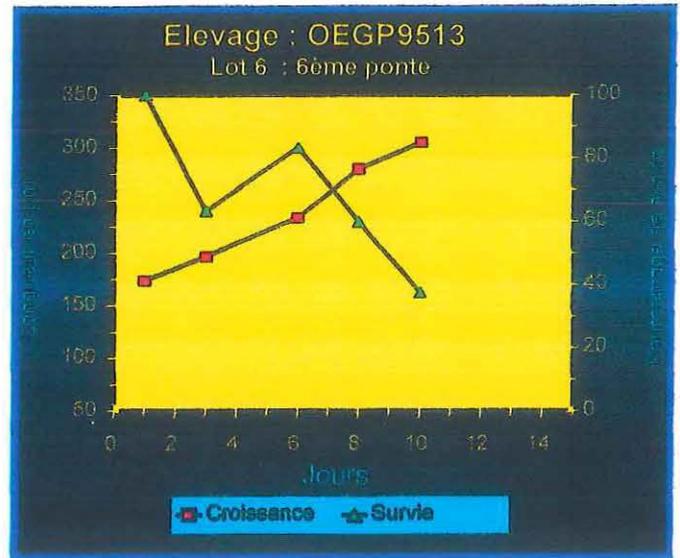
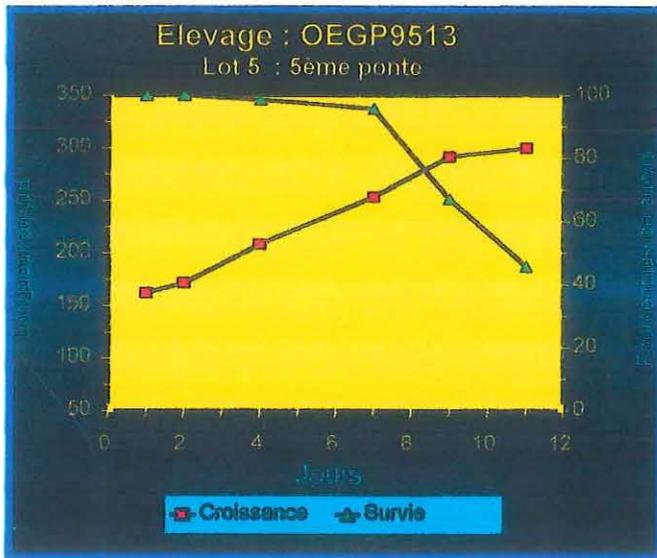


Fig 7. Comparaison de la croissance des 6 lots à partir du moment de la ponte jusqu'à la phase de fixation

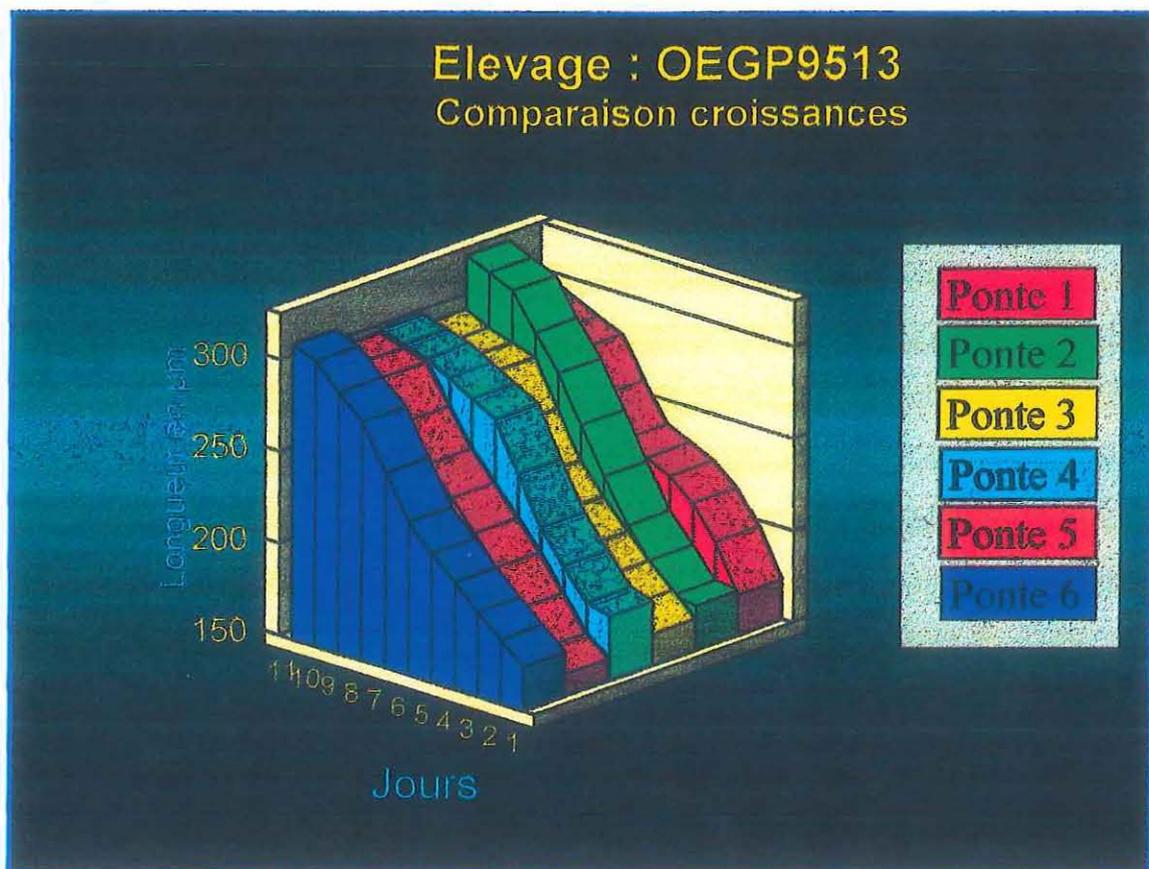
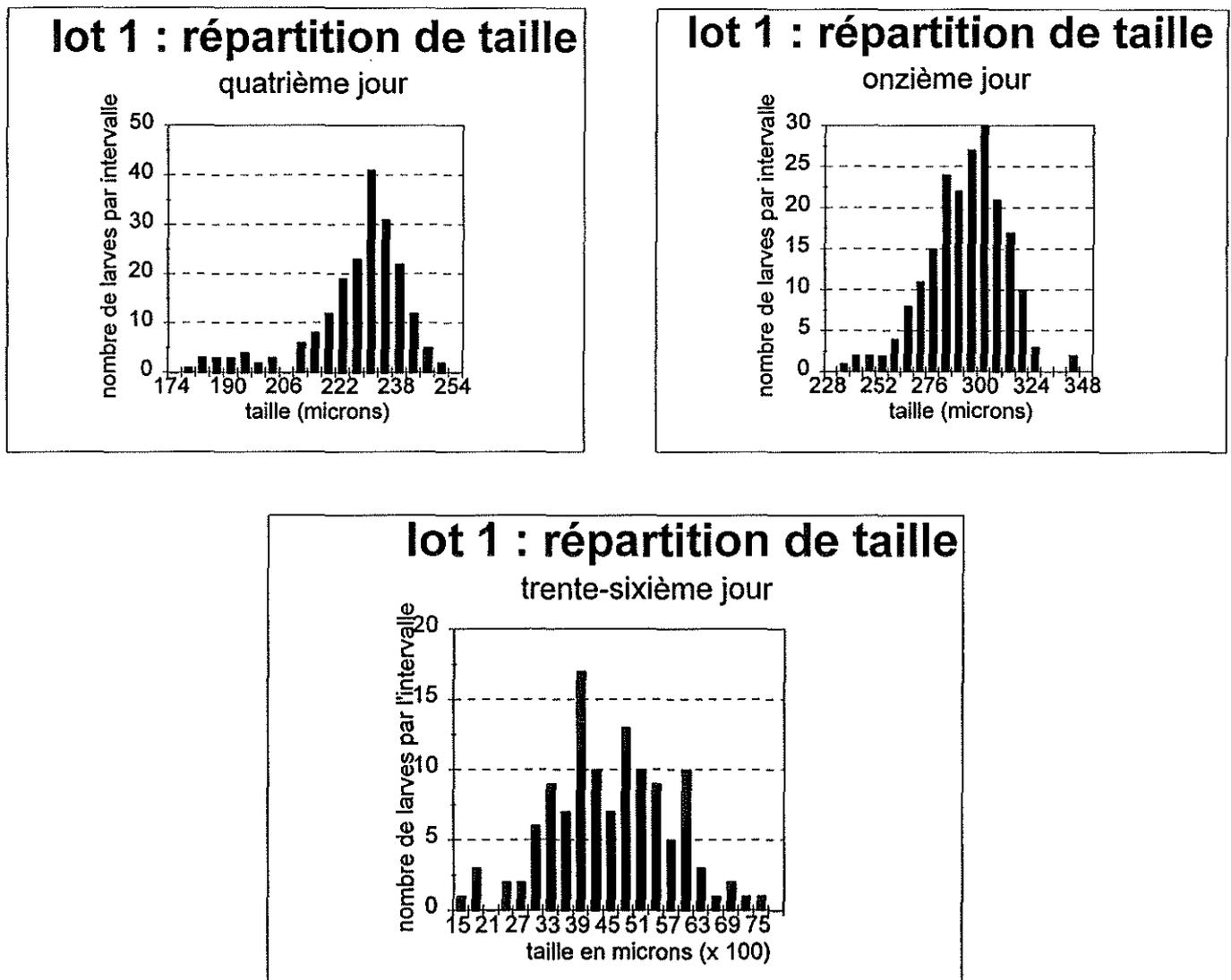


Fig 8. Suivi de la répartition des tailles au sein de la population de larves du lot 1, analyses effectuées sur des échantillons de 200, 200 et 100 larves respectivement.



II. Mise au point de l'analyse microsatellite par PCR

Outre les problèmes de mise au point des techniques de migration (optimisation de la composition du gel d'acrylamide en fonction de la taille des bandes, commande des bons peignes, espaceurs et joints de gel) qui furent assez rapidement réglés, plusieurs problèmes se sont successivement posés :

- apparition d'une bande parasite ne correspondant à aucun allèle et posant de nouvelles questions,
- qualité de l'extraction au Chelex,
- amplification insuffisante quelle que soit la technique d'extraction utilisée.

Ces différents problèmes ont en particulier conduit à l'optimisation des paramètres de la PCR.

1. Apparition d'une bande parasite

Voici en exemple deux gels (Figures 9 et 10) présentant une bande au environ de 60 paires de bases (pb). Les amorces ayant respectivement une longueur de 22 pb (F) et 21 pb (R), une telle bande ne peut s'expliquer que par un appariement des amorces entre elles. Du fait des températures élevées en phase d'hybridation et d'élongation, un tel appariement ne peut se produire en cours de PCR. Par contre, les amorces peuvent s'apparier à température plus basse, si elle possèdent suffisamment de régions homologues. Elles apparaîtront d'autant plus que leur proportion relative dans le mélange est grande et que la PCR ne s'est pas traduite par une amplification spécifique du microsatellite étudié. La localisation de cette bande à 60 pb (et non 20-22 pb) s'explique probablement par l'encombrement spatial de ces appariements hétérologues (Figure 11).

Fig 9. Gel de migration sur acrylamide; tous les puits sont doublés. De gauche à droite : marqueur (x2), témoin (x2), adulte extrait au phénolchloroforme présentant deux bons allèles (x2), même adulte extrait au Chélex (x2), puis trois (x2) larves extraites au Chélex.

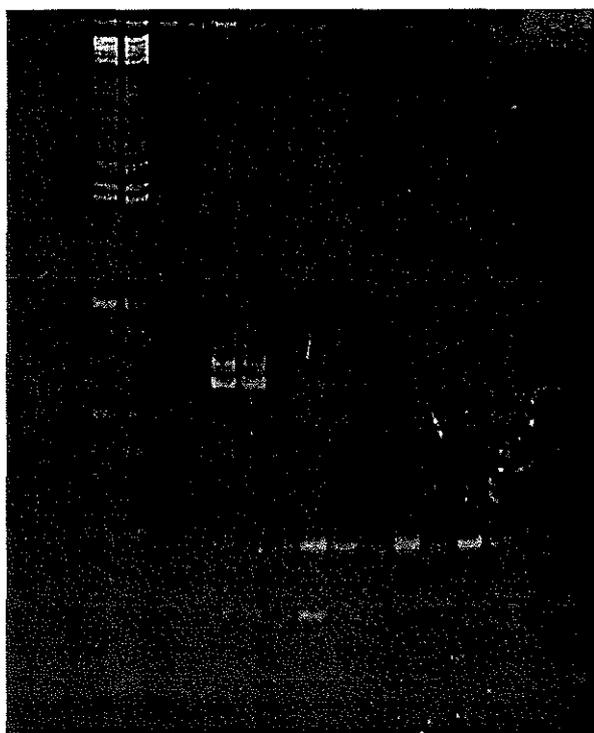


Fig 10. Gel de migration sur acrylamide; tous les individus sont des larves. On remarque qu'on peut tout juste distinguer une bande au dessus de la bande parasite; elle correspond aux allèles recherchés. Le marqueur de taille est le même dans les deux cas;

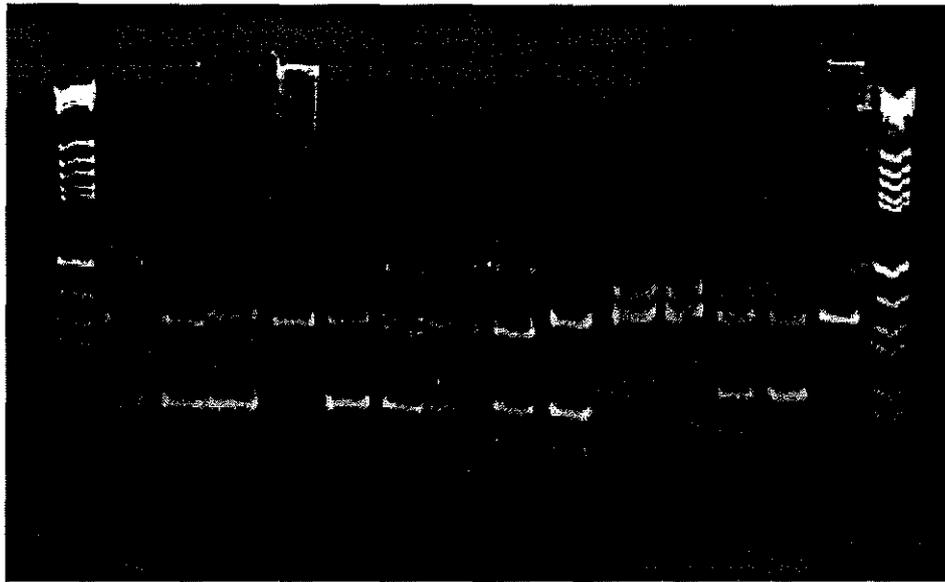


Un tel appariement peut paraître surprenant, sachant qu'en général, les amorces sont choisies dans les régions flanquantes de façon à ne présenter aucune homologie de séquence. Dans le cas présent, les séquences flanquantes utilisées pour la détermination des primers n'avaient qu'une longueur limitée, la banque génomique partielle ayant été construite à partir de fragments de longueur moyenne réduite (moyenne estimée à 195-200 pb). De ce fait, le programme de définition d'amorces n'a pu que choisir au mieux, et des homologies partielles de séquences sont donc possibles comme le montre la Figure 11 :

Fig 11. Appariements possibles pour le couple d'amorces de *Oedu.B0*.



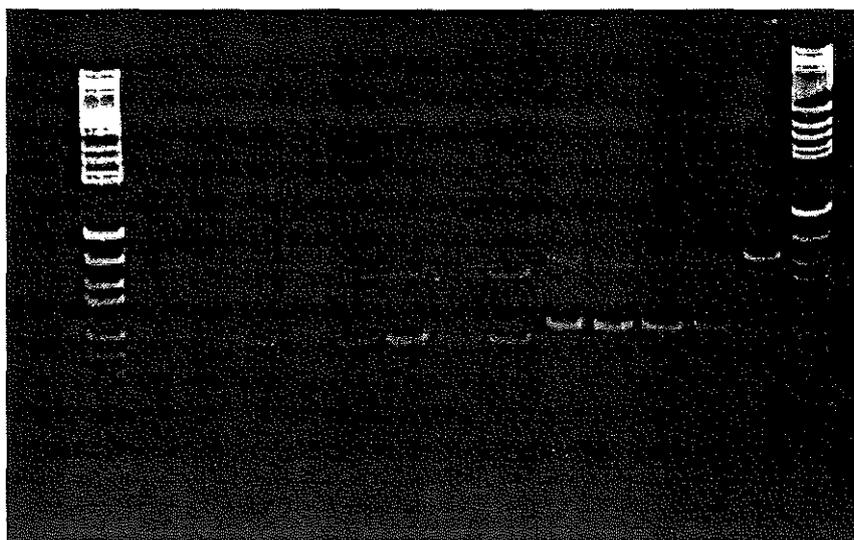
Fig 12. Gel de migration électrophorétique sur acrylamide (50 V pendant 1h, puis 300 V pendant 2h); les bandes représentent, de gauche à droite : le marqueur, le témoin sans ADN, les individus parentaux suivants, LR4, LR11, LR18, LR20, LR22, LR26, LR27, LR34, LR35, LR35 1/2, LR35 1/5, LR35 1/10, LR43, et le marqueur à nouveau.



La gamme de concentrations utilisée pour l'individu LR35 montre bien que les primers s'apparient d'abord à l'ADN avant de fabriquer des artéfacts entre eux. De plus, l'analyse spectrométrique a montré que les individus LR18 et LR43, pour lesquels n'apparaissent pas les bandes parasites, étaient à des concentrations supérieures à celle de LR35 (facteur 2) ou de LR11 (facteur 10) qui présente une forte bande parasite.

Une fois l'optimisation effectuée pour les adultes, un essai de mise au point a été tenté sur les larves. La première tentative eut lieu sur des larves du lot 1, au quatrième jour après la ponte, larves pour lesquelles l'ADN avait été extrait au Chélex (technique initialement prévue). Nous donnons ici le gel de migration obtenu (Figure 13). L'individu A16 a été testé à différentes concentrations et pour deux d'entre elles, une gamme de concentration des primers a été testée : A16 1/0,1 (ADN non dilué, primers dilués 10 fois); A16 0,5/1 (ADN dilué 2 fois, primers non dilués); A16 0,5/0,1 (ADN dilué 2 fois, primers dilués 10 fois); A16 0,5/0,01 (ADN dilué 2 fois, primers dilués 100 fois); A16 0,1/1 (ADN dilué 10 fois, primers non dilués); A16 0,1/0,1 (ADN dilué 10 fois, primers dilués 10 fois); A16 0,1/0,01 (ADN dilué 10 fois, primers dilués 100 fois).

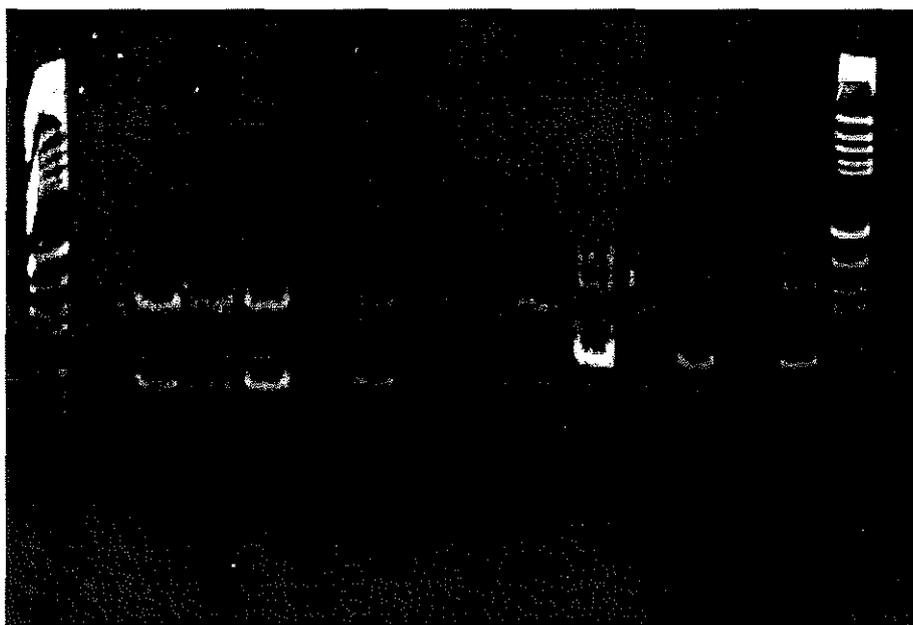
Fig. 13. Gel de migration électrophorétique sur acrylamide; de droite à gauche : marqueur, LR43, A1, A2, A3, A12, A13, A16 1/0,1, A16 0,5/1, A16 0,5/0,1, A16 0,5/0,01, A16 0,1/1, A16 0,1/0,1, A16 0,1/0,01, M



3. Qualité de l'extraction au Chelex

Tous les résultats obtenus sur des larves ou des adultes extraits au Chelex ont été insatisfaisant. Dans la majeure partie des cas, les amplifications étaient trop faibles pour permettre une identification certaine des allèles. Les résultats obtenus sur les adultes par extraction au phénol-chloroforme (Figure 12) étant plus interprétables, une extraction de l'ADN des larves par cette dernière méthode a été tentée. Une partie des résultats est présentée dans la Figure 14.

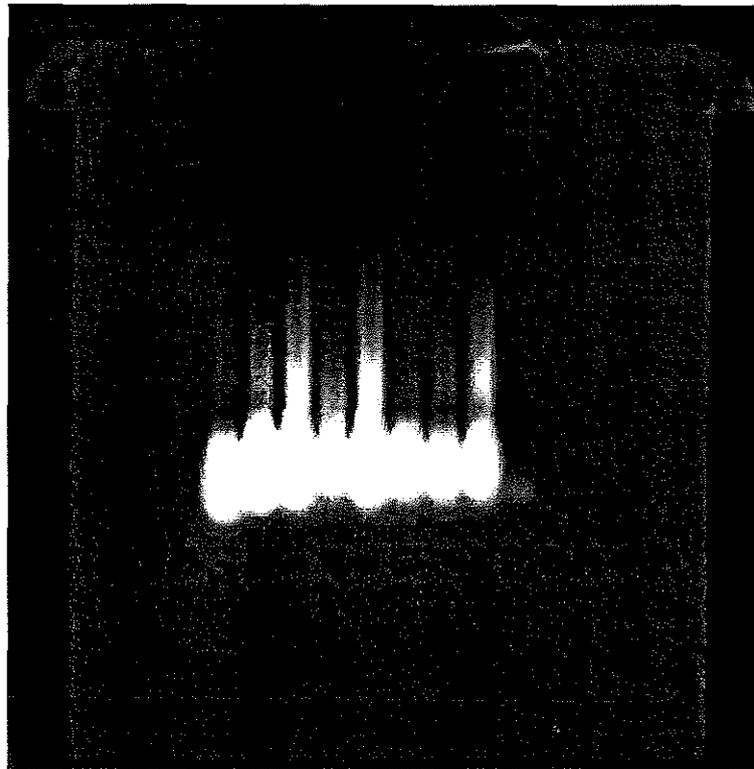
Fig 14. Gel de migration sur acrylamide. Deux larves ont subi une extraction au phénol-chloroforme (pistes 2 et 3, après le marqueur en piste 1). On ne voit pas de nette différence par rapport aux larves extraites au Chélex (pistes 4 à 15).



4. Qualité de l'amplification par PCR

Quelques soient les techniques utilisées et l'optimisation obtenue, les résultats d'amplification par PCR restent insuffisants. Il peut sembler étrange que l'analyse microsatellite de l'ADN des larves ne fournisse aucune réponse lisible, car de nombreux résultats ont pu être obtenus par PCR sur de bien plus petites quantités d'ADN chez d'autres organismes. Mais bien que la différence constatée entre l'analyse des adultes et celle des larves puisse dans une certaine mesure être expliquée par les quantités d'ADN présentes dans chacun des cas, un problème de dégradation de l'ADN est vraisemblablement apparu chez les larves. Ce phénomène a pu être constaté chez d'autres mollusques (Y. Naciri, com. pers.), et est sans doute lié à la présence de certaines enzymes (en particulier les enzymes digestives) qui dégradent très rapidement les tissus à la mort de l'individu. Dans le cas des adultes, l'ADN provient du manteau ou des branchies, qui ne contiennent pas d'enzyme susceptibles de le dégrader comme peuvent le faire les enzymes digestives. Un tel prélèvement n'est bien sûr pas possible pour des larves, dont la taille ne permet pas de séparer appareil digestif et reste de l'animal. Cette hypothèse pourrait donc expliquer un mauvais état de l'ADN. Nous présentons ci-dessous une migration d'ADN extrait de larves sur gel d'agarose, où une forte dégradation de l'ADN est nettement visible (Figure 15).

Fig 15. Gel de migration (du haut vers le bas) sur agarose de l'ADN de différentes larves, obtenu par extraction au phénol-chloroforme. La piste de droite contient un échantillon témoin de PCR contenant la bande parasite (environ 60 pb), et la tache sombre en travers des pistes est située entre 400 et 500 pb.



III. Premier résultats sur le polymorphisme des populations

En raison des difficultés rencontrées, nous avons décidé dans un premier temps d'analyser le polymorphisme microsatellitaire de la population parentale, tout en continuant, dans l'espoir d'une amélioration de la qualité des résultats, les expériences sur les larves.

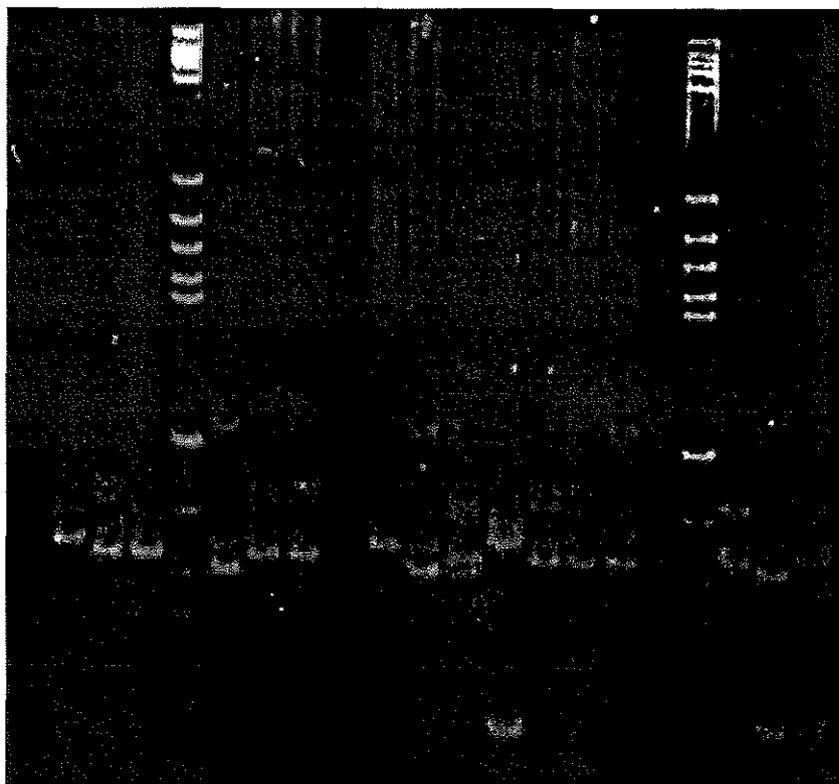
1. Population parentale

Le polymorphisme de 35 parents a été déterminé pour le locus *Oedu.B0*. Une partie des résultats est présentée Figure 16. Sept motifs différents ont été reconnus, pour 4 des 5 allèles répertoriés dans Naciri *et al.* (1995). Les fréquences respectives des allèles 90 pb, 93 pb, 96 pb et 99 pb sont de 8.6%, 31.4%, 44.3% et 15.7%. L'allèle 102 n'a pas été retrouvé dans cette population. La matrice des génotypes est donnée dans le Tableau 2.

Tab 2. Matrice génotypique sur les 35 individus analysés. Les effectifs attendus en cas d'équilibre de Hardy-Weinberg sont indiqués entre parenthèses.

	90	93	96	99
90	0 (0.22)			
93	1 (1.91)	4 (3.35)		
96	5 (2.70)	12 (9.88)	2 (6.74)	
99	0 (0.96)	1 (3.51)	10 (4.94)	0 (0.80)

Fig 16. Gel de migration sur acrylamide. Parents LR25 à LR44. En piste 1 : individu hétérozygote 96-99, en piste 2 : individu hétérozygote 93-96, en piste 5 : individu hétérozygote 90-96, en piste 11 : individu 90-93, en piste 15 : individu 93-99, en piste 16 : individu homozygote 93-93. Il n'y a aucun individu homozygote pour l'allèle 96 sur ce gel.



L'écart à l'équilibre de Hardy-Weinberg a été testé en utilisant le logiciel GENEPOP (Raymond et Rousset, 1994). Du fait du faible effectif de la population, le test exact de Fisher a été mis en oeuvre. Le Fis calculé ($Fis = (\text{fréq. obs.} - \text{fréq. att.}) / \text{fréq. att.}$) est égal à -0.217 et la probabilité d'obtenir une telle valeur en supposant l'équilibre de Hardy-Weinberg est de 1.57%. Avec un risque de première espèce de 5%, on peut rejeter l'hypothèse et le signe du Fis indique qu'il y a un excès en hétérozygotes dans la population parentale.

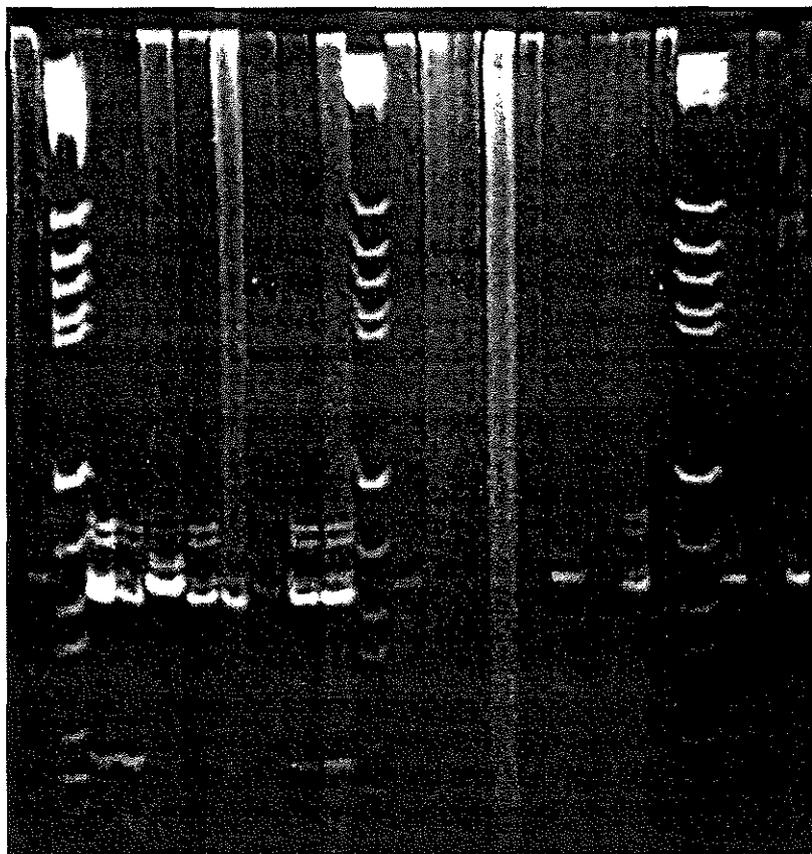
2. Population post-larvaire (3ème ponte)

En raison des difficultés rencontrées pour l'amplification d'ADN à partir de larves, un essai a été fait sur une population plus âgée (post-larves, taille moyenne de 4.06 ± 1.96 mm). Des résultats préliminaires sont présentés Figure 17. Malgré le faible nombre d'amplifications obtenues (17 individus seulement), un traitement statistique par GENEPOP a été effectué. Les fréquences alléliques dans la sous-population étudiée sont respectivement pour les allèles 90, 93, 96 et 99 de 0%, 26.5%, 61.7% et 11.8%. La matrice génotypique est reproduite dans le Tableau 3 et le Fis obtenu est de -0.405 ($p=0.134$). Bien que l'hypothèse de l'équilibre ne puisse être rejetée au risque α de 5%, une tendance à un excès en hétérozygotes est néanmoins relevée. La petite taille de l'échantillon doit cependant faire prendre ces résultats avec précaution.

Tab 3. Matrice génotypique sur les 17 individus analysés. Les effectifs attendus en cas d'équilibre de Hardy-Weinberg sont indiqués entre parenthèses.

	90	93	96	99
90	0 (0.00)			
93	0 (0.00)	0 (1.19)		
96	0 (0.00)	9 (5.56)	4 (6.47)	
99	0 (0.00)	0 (1.06)	4 (2.55)	0 (0.24)

Fig 17. Gel de migration sur acrylamide. Post-larves de la 3ème ponte. En piste 1 : individu homozygote 96-96, en piste 3 : individu hétérozygote 93-96, en piste 5 : individu hétérozygote 96-99, en piste 11 : individu 90-93, en piste 15 : individu 93-99, en piste 16 : individu homozygote 93-93. Il n'y a aucun individu homozygote pour l'allèle 96 sur ce gel.



Discussion

1. Optimisation des techniques

Une amélioration des techniques d'analyse a été obtenue au cours du stage. La bonne visualisation des bandes sur le dernier gel en est la preuve (Figure 17). Cependant, l'étude des larves avant fixation n'est toujours pas accessible dans l'état actuel de l'optimisation réalisée. Plusieurs voies d'amélioration sont possibles :

- Une meilleure conservation des larves devrait permettre d'obtenir une meilleure qualité d'ADN. Il s'agit de s'assurer que les enzymes digestives sont inactivées en effectuant une congélation plus rapide des échantillons après immersion dans de l'éthanol absolu.
- Il semblerait que dans un premier temps, la technique d'extraction au phénol-chloroforme soit préférable au Chelex : le phénol a en effet comme propriété d'inactiver les enzymes et cela permettrait peut-être de réduire la dégradation de l'ADN. Les résultats positifs obtenus sur les post-larves du lot 3 sont encourageants à cet égard.
- La qualité de l'amplification par PCR peut éventuellement être améliorée par l'allongement des stades de dénaturation et d'élongation.

Ces améliorations n'ont pas encore toutes été testées mais vont faire l'objet des prochaines expérimentations menées au laboratoire.

2. Analyse de la croissance et du développement des différents lots

La Figure 7 présentant la comparaison en croissance des 6 lots confirme l'homogénéité des élevages (cuves identiques, même milieu de culture : eau de mer chauffée, même bullage); les courbes d'évolution permettent en effet de suivre les différences entre les pontes, et leur similarité prouve qu'aucune ponte n'a subi d'évolution anormale. Nous nous retrouvons donc dans des conditions expérimentales intéressantes pour une étude comparative des populations. Les fortes mortalités visibles sur les courbes de survie (Figure 6) montrent des évolutions normales et représentatives des mortalités habituellement obtenues en éclosérie.

L'évolution de la répartition en tailles des larves au sein d'une même ponte (Figure 8) permet de faire deux remarques intéressantes :

- Les deux premiers histogrammes (quatrième jour et onzième jour) présentent un aspect de «gaussienne à queue»; ces «queues» pourraient être constituées de larves non viables. En effet, la stratégie de reproduction de l'huître est plus une stratégie de quantité que de qualité et une grande part des larves d'huîtres présentent des anomalies génétiques (aneuploïdie en particulier) qui les handicapent dans leur développement. Signalons toutefois que l'huître plate *Ostrea edulis* fabrique environ 10 fois moins d'ovules que l'huître creuse *Crassostrea gigas*, qui par contre ne nurse pas les larves pendant 10 jours dans la cavité palléale.
- La variabilité en taille de la population semble augmenter avec le temps; cela est particulièrement visible pour la répartition des tailles au trente-sixième jour soit après fixation (troisième histogramme) mais le phénomène s'amorce dès le stade larvaire. Or les conditions d'élevage au sein d'une même population sont très homogènes (bullage permettant le mélange jusqu'à la fixation, puis homogénéisation des tamis de fixation tous les jours lors du nettoyage). Si l'influence du milieu s'avère être effectivement aussi homogène entre individus, cette variabilité interne de la population pourrait donc être déterminée par la variabilité génétique de la population, mais cela reste bien entendu à démontrer.

3. Les enjeux scientifiques de cette étude

L'étude de la relation hétérozygotie-croissance n'a pas pu être abordée dans le cadre de ce stage, faute de résultats suffisants sur les larves et post-larves. Seule une première étude du déficit en hétérozygotes a pu être effectuée. Nous sommes bien sûr conscients de n'avoir travaillé que sur un seul marqueur et qu'il n'est bien entendu pas imaginable de généraliser les résultats obtenus à l'ensemble du génome.

Cependant, l'étude des adultes nous livre des renseignements intéressants bien qu'incomplets sur l'étude du déficit en hétérozygotes. En effet, le pourcentage d'homozygotes (17.1 %) est faible en regard du pourcentage

théorique attendu (31.7 %). Bien qu'il ne s'agisse pas du même type de marqueur, ces résultats corroborent ceux obtenus sur l'évolution du déficit en hétérozygotes aux locus enzymatiques. Par ailleurs, des résultats non publiés obtenus au laboratoire montrent qu'il existe, sur du naissain de 6 mois, des déficits en hétérozygotes importants voire très importants (de 10 à 40%) sur les 3 locus microsatellites étudiés. Bien que les deux analyses n'aient pas été effectuées sur les mêmes populations, les résultats obtenus semblent montrer, comme pour les enzymes, une réduction du déficit en hétérozygotes en fonction de l'âge. Si ce phénomène est confirmé sur un nombre plus important de locus microsatellites, l'hypothèse d'une contre-sélection aux stades jeunes des hétérozygotes (au niveau du génome dans sa totalité et non plus aux locus enzymatiques seulement) suivie d'un effet contraire aux stades ultérieurs devrait se trouver renforcée. L'influence de l'aneuploïdie peut aussi donner des résultats similaires mais la tendance ne devrait se manifester que pour certains marqueurs (ceux portés par le chromosome manquant).

Toutes ces hypothèses nécessitent bien entendu plus amples expérimentations. Les résultats provisoires obtenus sur les post-larves du lot 3 semblent au contraire indiquer une tendance à un déficit en homozygotes contrairement à ce qui a été observé sur le naissain naturel de 6 mois. Ces résultats sont peut-être imputables aux conditions contrôlées dans lesquelles les élevages ont été menés. En effet, certaines études ont montré l'absence de déficits en hétérozygotes pour les locus enzymatiques sur du naissain en provenance d'écloserie. Le phénomène serait-il le même pour les locus microsatellites ?

Bibliographie

- Blanc F. & Bonhomme F. (1986). Polymorphisme génétique des populations naturelles de mollusques d'intérêt aquicole. Symposium on Selection, Hybridization and Genetic Engineering in Aquaculture of Fish and Shellfish for Consumption and Stocking. Bordeaux (France).
- Booth C.L., Woodruff D.S. & Gould S.J. (1990). Lack of significant associations between allozyme heterozygosity and phenotypic traits in the land snail *Cerion*. *Evolution*, **44** (1) : 210-213.
- Borsa P., Zainuri M. & Delay B. (1991). Heterozygote deficiency and population structure in the bivalve *Ruditapes decussatus*. *Heredity*, **66** : 1-8.
- Bradley C. Congdon. (1994). Salinity-related fitness differences amongst GPI genotypes in the mosquitofish *Gambusia holbrooki* (poeciliidae: Teleostei). *Bio. J. of Linn. Soc.*, **53**: 343-352.
- David P., Delay B., Berthou P. & Jarne P. (1995). Alternative Models for Allozyme-Associated Heterosis in the Marine Bivalve *Spisula ovalis*. *Genetics*, **139**: 1719-1726.
- Diehl W.J. & Koehn R.K. (1985). Multiple-locus heterozygosity, mortality and growth in a cohort of *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.*, **88** : 265-271.
- Faithbrother J.E. & Beaumont A.R. (1993). Heterozygote deficiencies in a cohort of newly settled *Mytilus edulis* spat. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, **73** : 647-653.
- Foltz D.W. (1986). Null alleles as a possible cause of heterozygote deficiencies in the oyster. *Evolution*, **40** : 869-870.
- Gaffney P.M. (1990). Enzyme heterozygosity, growth rate, viability in *Mytilus edulis* : an other look. *Evolution*, **44** : 204-210.
- Hughes J.M., Harrison D.A. and Arthur J.M. (1991). Genetic variation at the Pgi locus in the mosquito fish *Gambusia affinis* (Poeciliidae) and a possible effect on susceptibility to an insecticide. *Bio. J. of Linn. Soc.*, **44**: 153-167.
- Jaziri H. (1990). Variations génétiques et structuration biogéographique chez un bivalve marin : l'huître plate *Ostrea edulis* L. Thèse de l'Université Montpellier II. 171p.
- Koehn R.K. & Gaffney P.M. (1984). Genetic heterozygosity and growth rate in *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.*, **82** : 1-7.
- Koehn R.K., Diehl W.J. & Scott T.M. (1988). The differential contribution by individual enzymes of glycolysis and protein catabolism to the relationship between heterozygosity and growth rate in the coot clam, *Mulinia lateralis*. *Genetics*, **118** : 121-130.
- Ledig F.T., Raymond P.G. & Bonefeld B. (1987). The relation of growth to heterozygosity in pitch pine. *Evolution*, **37**(6) : 1227-1238.
- Liskauskas A.P. & Fergusson M.M. (1990). Enzyme heterozygosity and fecundity in a naturalized population of brook Trout (*Salvelinus fontinalis*). *Can. J. of Fish. Aqua. Sc.*, **47** : 2010-2015.
- Naciri Y., Vigouroux Y., Dallas J., Desmarais E., Delsert C. & Bonhomme F., (Submitted). Identification and inheritance of (GA/TC)_n and (AC/GT)_n repeats in the flat oyster *Ostrea edulis*. *Mol. Mar. Biol. Biotech.*, **4**(1) : 83-89.

- Pogson G.H. & Zouros E. (1994).** Allozyme and RFLP heterozygosities as correlates of growth rate in the scallop *Placopecten magellanicus* : A test of the associative overdominance hypothesis. *Genetics*, **137** : 221-231.
- Raymond M. & Rousset. F. (1994).** GENEPOP logiciel pour PC. CNRS, F34000 Montpellier.
- Sarver S.K, Katoh M. & Foltz D.W (1992).** Apparent overdominance of enzyme specific activity in two marine bivalves. *Genetica*,
- Singer-Sam et al. (1989).** Use of Chelex to improve the PCR signal from a small number of cells. *Amplifications* : 3, 11.
- Singh S.M. & Zouros E. (1981).** Genetics of growth rate in oysters and its implications for aquaculture. *Can. J. Genet. Cytol.* : 119-130.
- Thiriou-Quévieux C., Noël T., Bougrier S. & Dallot S. (1988).** relationships between aneuploidy and growth rate in pair mating of the oyster *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*, **75** : 89-96.
- Valdès A.M., Slatkin M. & Freimer N.B (1993).** Allele frequencies at microsatellite loci: The stepwise mutation model revisited. *Genetics*, **133** : 737-749.
- Vigouroux Y. (1994).** Relation hétérozygotie-croissance chez l'huître plate *Ostrea edulis*. Marqueurs protéiques et microsatellites. DEA "Evolution et Ecologie", Université Montpellier II.
- Vockaert F. & Zouros E (1989).** Allozyme and physiological variation in the scallop *Placopecten magellanicus* and a general model for the effects of heterozygosity on fitness in marine bivalve. *Mar Biol.*, **103** : 51-61.
- Zouros E. & Foltz D.W. (1987).** The use of allelic isozyme variation for the study of heterosis. *Isozymes* : *Curr. Top. Biol. Med. Res.*, **13** : 1-59.
- Zouros E. & Pogson G.H. (1994).** Heterozygosity, heterosis and adaptation. *Genetics and Evolution of Aquatic Organisms*. Edited By A.R. Beaumont, Chapman & Hall, pp 135-146.