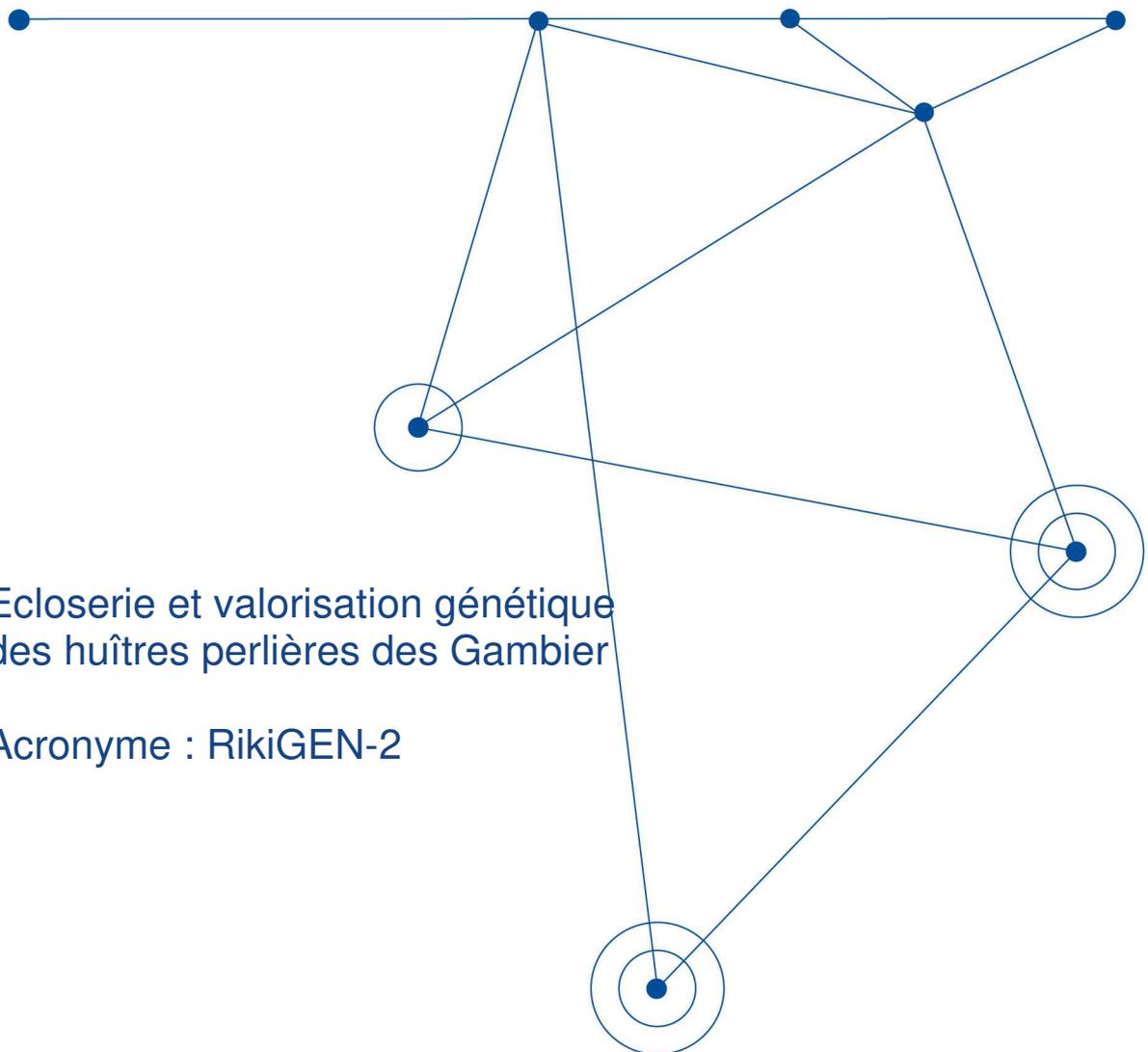


CONVENTION RIKIGEN-2 RAPPORT INTERMEDIAIRE #2 N°/MDA/DRMM DU 11/2016



CONVENTION RIKIGEN-2

RAPPORT INTERMEDIAIRE #2

N°9535/MEI/DRMM DU 06/12/2016

**Ecloserie et valorisation génétique
des huîtres perlières des Gambier
Acronyme : RikiGEN-2**



Fiche documentaire

Titre du rapport : Écloserie et valorisation génétique des huîtres perlières des Gambier Acronyme : RikiGEN-2	
Référence interne : RBE/RMPF/LABO AN-NUM Diffusion : <input type="checkbox"/> libre (internet) <input checked="" type="checkbox"/> restreinte (intranet) – date de levée d'embargo : 2025/01/01 <input type="checkbox"/> interdite (confidentielle) – date de levée de confidentialité : AAA/MM/JJ	Date de publication : 2018/11/30 Version : 1.0.0 Référence de l'illustration de couverture KY Chin-Long/ Juvéniles d'huîtres perlières <i>P. margaritifera</i> d'écloserie d'une même cohorte et présentant un différentiel de croissance contrasté (tête et queue de lot). Langue(s) : Française
Résumé/ Abstract : <p>RikiGEN-2 est un projet de R&D d'une durée de 4 ans (2016-2019), qui fait suite au projet RikiGEN (Valorisation génétique des huîtres perlières de l'archipel des Gambier) financé par le Ministère des Outre-mers (appel à projet MOM sur la période 2013 à 2015). L'écloserie de production associée à la sélection génétique appliquée à l'huître perlière <i>P. margaritifera</i> constitue une voie privilégiée pour améliorer la qualité de production. Grâce au partenariat avec un industriel écloreur, la SCA Regahiga, des animaux issus des premiers cycles de sélection sur la couleur et la croissance vont pouvoir être étudiés à l'échelle de la production aussi bien en tant qu'huîtres donneuses que receveuses. La comparaison des performances en production des huîtres perlières issues d'écloserie, en comparaison aux témoins sauvages (issus de collectage naturel), permettra : 1) d'estimer le progrès génétique réalisé, dans le cadre d'un dispositif multi-sites et pluriannuels, et 2) d'évaluer le niveau de variabilité génétique au sein des descendants produits en écloserie. Par ailleurs, les outils de biologie moléculaire développés tant pour le greffon (croissance coquillière) que pour la poche perlière (croissance perlière), permettront la recherche de signatures moléculaires spécifique d'une mutation de coloration de chair (et de perle) et des performances de croissance. Ces travaux nous permettront de répondre aux questions majeures suivantes : 1) quelle est la stratégie de sélection génétique la plus adaptée à <i>P. margaritifera</i> ?, 2) quels sont les gains génétiques possibles sur la croissance ?, 3) les familles d'écloserie sont-elles génétiquement moins variables que celles issues du collectage naturel ?, et 4) quels sont les biomarqueurs à l'origine de la variation de la qualité des perles de culture ?</p>	
Mots-clés/ Key words : Écloserie; Sélection; Diversité génétique; Gambier	
Comment citer ce document : Ky Chin-Long (2017). Écloserie et valorisation génétique des huîtres perlières des Gambier Acronyme : RikiGEN-2. Rapport intermédiaire #1 n°9535/MEI/DRMM du 06/12/2016.	

Disponibilité des données de la recherche : confidentielles

DOI : sans objet

Commanditaire du rapport :

La Direction des Ressources marines et minières
 B.P. 20, 98.713 Papeete –TAHITI
 Polynésie française
 Immeuble Lecaill, 2ème étage, Fare Ute
 Tél. : (689) 40 50 25 50, Fax. : (689) 40 43 49 79
 Email : drm@drm.gov.pf , site internet : www.peche.pf

Nom / référence du contrat :

- Rapport intermédiaire (réf. bibliographique : XXX)
 Rapport définitif (réf. interne **du rapport intermédiaire** : R.DEP/UNIT/LABO AN-NUM/ID ARCHIMER)

Projets dans lesquels ce rapport s'inscrit (programme européen, campagne, etc.) :

Convention de recherche avec la DRMM

Auteur(s) / adresse mail

KY Chin-Long / chinky@ifremer.fr

Affiliation / Direction / Service, laboratoire

RBE/ RMPF

Encadrement(s) : sans objet

Destinataire :

La Direction des Ressources marines et minières
 B.P. 20, 98.713 Papeete –TAHITI
 Polynésie française
 Immeuble Lecaill, 2ème étage, Fare Ute
 Tél. : (689) 40 50 25 50, Fax. : (689) 40 43 49 79
 Email : drm@drm.gov.pf , site internet : www.peche.pf

Validé par :

Dr. Benoît BELIAEFF
 Directeur du Centre Ifremer du Pacifique
 Responsable de l'unité RMPF
 &
 M. Dominique DEVAUX
 Gérant de la SCA Regahiga Pearl

Sommaire

1. Introduction	p5
2. Greffes expérimentales impliquant des individus sauvages vs. éclosion.	p6
3. Variabilité génétique	p8
3.1 Matériels et méthodes	p9
3.2 Résultats	p12
3.3 Discussion	p15
4. Interactions génotype x environnement	p19
5. Analyse du transcriptome	p19
6. Références	p20
Annexe	p23

CONFIDENTIEL

1. Introduction

Pour rappel, la convention RikiGEN-2 se propose de poser les bases pratiques et théoriques de la mise en exploitation à l'échelle de la production, d'huîtres perlières produites en éclosérie. Ces huîtres perlières sont évaluées pour leur potentiel en tant que donneuses de greffon (sélection sur des critères de couleur), mais aussi en tant que receveuses (sélection sur des critères de croissance). Cette convention bénéficie du matériel biologique produit par un éclosier d'huîtres perlières situé sur l'archipel des Gambier, la SCA Regahiga.

L'année 2018 est marquée par :

- 1) l'analyse complète de la diversité génétique de lots d'éclosérie F1 et F2, en comparaison à des lots sauvages issus du collectage naturel au Gambier, à l'aide d'un jeu de 9 marqueurs microsatellites. Au total, se sont 12 cohortes de 40 génotypes chacun (soit 480 génotypes) qui ont été analysées. L'ensemble des résultats est consigné dans la partie Diversité génétique de ce présent rapport.
- 2) Le lancement de greffes expérimentales à partir de 2 familles produites en éclosérie (en tant que donneuse et receveuse) et totalisant 1230 opérations. Ces greffes ont été réalisées à partir de 3 tailles de coquilles de receveuse (performance de croissance) contrastées : queue, moyen et tête de lot). Les récoltes prévues seront opérées en fin de projet (fin 2019) et les analyses associées en 2020 (au-delà du projet).

Le tableau 1 ci-dessous illustre (selon un découpage action par action) l'état d'avancement du projet sur les quatre années de son financement.

		2016			2017			2018			2019			avancée
A	Production du matériel biologique													réalisé
	Greffes S x G1													en cours
	Greffes S x G1 x G2 & F2													à prévoir
B	Variabilité génétique des lots													réalisé
C	Greffe multi-site													prévu
D	Transcriptome "QL/TL"													réalisé
	Transcriptome "chair ORA"													réalisé

Tableau 1. Découpage des actions de recherche réalisées et en cours de la convention RikiGEN-2.

2. Greffes expérimentales impliquant des individus sauvage vs. éclosion.

Les individus impliqués dans ces greffes ont été produits lors des saisons de reproduction 2015-2016 pour les familles F1 (nommés NC14 et B10 ; issus de croisements multi-parentaux à partir de géniteurs sélectionnés sur la couleur de la face interne) et en octobre 2017 pour les familles F2 (issus de croisements croisement bi-parentaux). Ces descendants F2, utilisés en tant que donneuses et receveuses ne seront exploitables en greffe qu'à la fin 2019 (2 ans d'âge – hors convention).

Pour les familles NC14 et B10 (individus F1), les greffes ont été réalisées en juin 2018, avec donc les récoltes associées fin 2019. Trois variables quantitatives seront systématiquement relevées fin 2019 : le poids, l'épaisseur et la vitesse du dépôt perlier, ainsi que cinq variables qualitatives : la foncitude, la couleur dominante, le lustre, la qualité de surface et le grade de la perle. Les analyses et valorisations de données associées seront opérées hors convention (au-delà de 2019).

Des tris de tailles ont été opérés en 2017 (voir rapport initial 2017) sur ces deux familles, afin d'aboutir à trois catégories de tailles pour les greffes expérimentales : les têtes de lots (TL : les huîtres présentant les plus grande en taille), les médiums (CC : huîtres de taille de coquille moyenne) et les queues de lot (QL : les huîtres de plus petite taille) (voir rapport intermédiaire #1, 2017). Le tableau 2 ci-dessous récapitule les effectifs greffés.

Famille B10			
Lot taille	Queues (QL)	Medium (M)	Têtes (TL)
Nombre de greffes	190	190	190
19 donneuses / 570 greffes / 57 kangarous			

Famille NC14			
Lot taille	Queues (QL)	Medium (M)	Têtes (TL)
Nombre de greffes	220	220	220
22 donneuses / 660 greffes / 66 kangarous			

Tableau 2. Récapitulatif des effectifs des familles F1 (B10 et NC14) greffées selon leur taille.

Le checking de l'ensemble des huîtres greffées a été opéré 6 semaines post-greffe. Les résultats ont été consignés dans la figure 1. Quelle que soit la famille F1 considérée, le taux de rétention est significativement en faveur des individus TL et au détriment des QL. Seule la famille NC14 présente une différence significative entre les QL et CC, au détriment des QL.

En même temps que le checking, toutes les huîtres ayant retenu leur nucleus ont été individuellement mesurées (poids, hauteur et largeur de la coquille), afin de suivre leur croissance tout au long de la période de culture (formation de la perle).

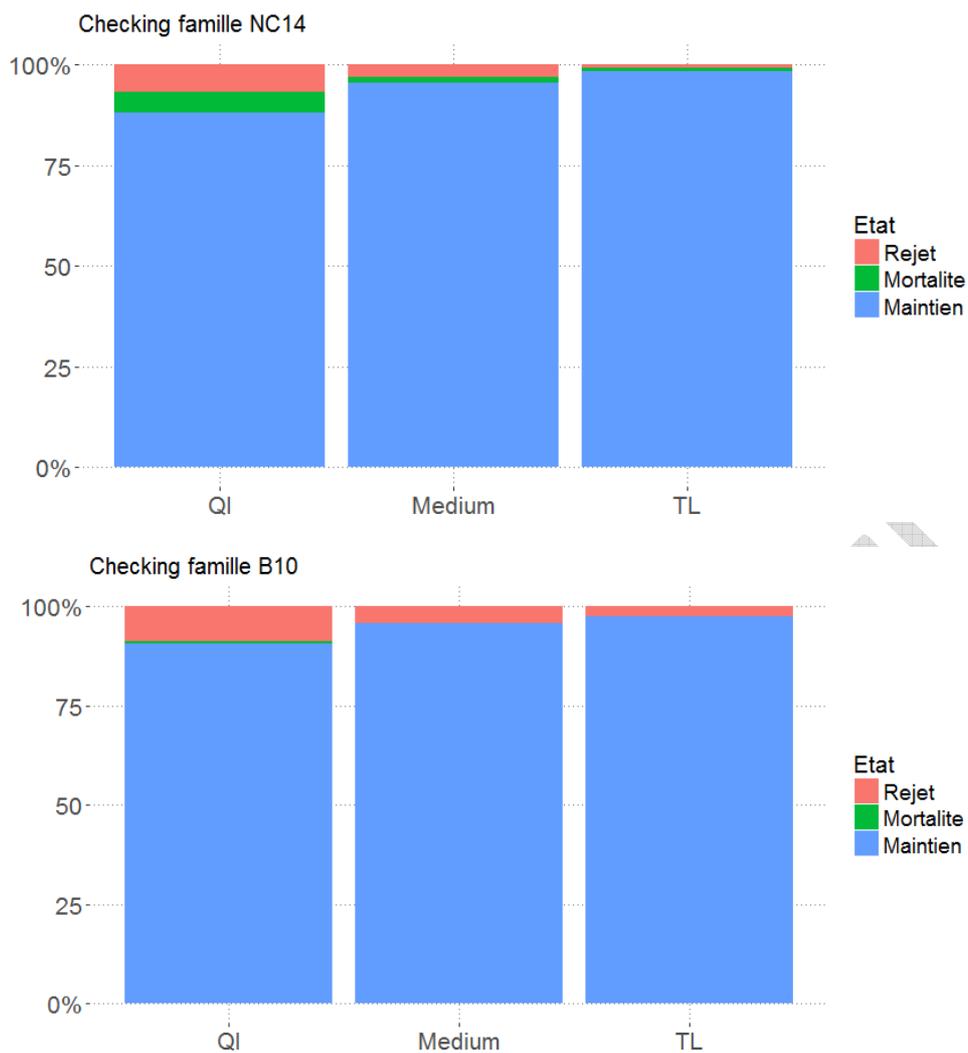


Figure 1. Histogrammes illustrant les taux de maintien, rejet et mortalité post-greffe des individus issus des familles F1 (B10 et NC14) greffées selon leur taille.

3. Variabilité génétique

En Polynésie française, il existe deux écloséries dont une seule produit du naissain pour la filière (E. Maressal à Fakarava) et la production actuelle est principalement axée sur la collecte de naissain et de géniteurs sauvages, afin de produire des cohortes F1 et F2 destinées à la production commerciale. Il existe toutefois un intérêt croissant pour la fermeture du cycle de reproduction en vue du lancement de programmes de sélection génétique, parallèlement à l'amélioration zootechnique des systèmes de production en éclosérie. Considérant que les huîtres sont des géniteurs extrêmement féconds, on observe souvent dans les écloséries de fortes variabilités dans le succès de la reproduction et une contribution parentale disproportionnée, dans lesquelles peu d'individus contribuent aux générations suivantes (Boudry, 2009 ; Zhang, *et al.*, 2018). Sans une gestion appropriée des productions en éclosérie, la perte de diversité génétique et l'augmentation de la consanguinité peuvent être un problème, déjà observé dans les lignées de production de nombreuses espèces aquacoles ayant des cycles biologiques similaires (In, *et al.*, 2016; Knibb, *et al.*, 2014; Lind, *et al.*, 2009; Loughnan, *et al.*, 2013; Vela Avitúa, *et al.*, 2013; Wang, *et al.*, 2016). La perte continue de diversité génétique et l'augmentation de la consanguinité ont également eu des effets néfastes sur le potentiel de production (Lind, *et al.*, 2009). Par conséquent, il est essentiel d'étudier l'effet des procédures d'élevage en routine des écloséries, sur l'acquisition et la conservation de la diversité génétique dans un système d'exploitation commerciale, en particulier si l'on veut garantir le succès d'un programme de sélection durable.

L'approvisionnement d'individus de *P. margaritifera* destinés à être utilisés en éclosérie au sein de l'archipel des Gambier est soumis à une réglementation gouvernementale, qui restreint l'importation d'individus provenant de l'extérieur de l'archipel en raison des effets néfastes que les précédents transferts ont eu sur les populations naturelles en Polynésie française. Par exemple, d'importants transferts/translocations historiques d'huîtres en 1994 et 1995 entre les archipels de la Société et des Tuamotu en Polynésie française ont conduit à l'homogénéisation génétique de la diversité de certaines populations naturelles (Arnaud-Haond *et al.*, 2004 ; Lemer et Planes, 2012). En outre, des niveaux de consanguinité élevés, de perte de diversité génétique et de réduction de la taille effective de la population ont été signalés au sein de populations naturelles situées à proximité de fermes utilisant des huîtres transférées (Lemer et Planes, 2012). Comme la diversité naturelle de la population de *P. margaritifera* dans le lagon de Mangareva de l'archipel des Gambier reste relativement pure et génétiquement différenciée des autres populations de Polynésie française (Lemer et Planes, 2014), les stocks d'éclosérie ne peuvent être localisés que localement pour assurer la préservation de cette origine.

La production en éclosérie dans l'archipel des Gambier repose donc actuellement sur la collecte de naissain sauvage lors des phases de recrutement au sein du lagon de Mangareva. Pour évaluer le niveau de diversité génétique au cours des phases de recrutement du naissain et étudier la part de la diversité génétique représentée dans les populations d'éclosérie, ainsi que la vitesse à laquelle elle peut être perdue dans un environnement de production commerciale pour *P. margaritifera*, cette étude a comparé la diversité génétique entre des lots de naissain collectés et des cohortes d'éclosions F1 et F2 produites commercialement dans l'archipel des Gambier. L'étude de la diversité et de la différenciation génétiques entre les générations successives des cohortes d'éclosérie sélectionnées est essentielle à la réalisation durable du progrès génétique souhaité, à la stabilité à long terme du programme de sélection et à la prévention de l'érosion génétique (Boudry, 2009 ; Zhang, *et al.*, 2018).

3.1 Matériels et méthodes

Afin d'établir des estimations de base de la diversité génétique dans l'archipel de Gambier (Polynésie française), des huîtres perlières sauvages ont été collectées sous forme de naissain en 2016 sur 3 sites de collectage différents dans le lagon de Mangareva au cours du printemps (octobre à décembre 2016): Matautea (N = 40 ; GPS 23 ° 06'48,74 "S / 134 ° 55'59,78" W), Peiriki (N = 40 ; GPS 23 ° 06'43.32 "S / 134 ° 55'14,39" W) et Rikitea (N = 40 ; GPS 23 ° 06'54,30 "S / 134 ° 56'58,24" W) (Tableau 3 et Figure 2). Des techniques passives ont été utilisées pour capturer les naissains à l'aide de collecteurs commerciaux composés de matériaux synthétiques, auxquels les larves de mollusques planctoniques s'attachent quinze à vingt jours après leur libération. La technique consiste à immerger une corde à une profondeur de 3 m, étirée entre des bouées et amarrée à des poids placés au fond du lagon. Les cordes ainsi suspendues sont composées de collecteurs de 80 cm de long répartis tous les mètres sur une longueur totale de 100 à 200 m. Tous les naissains sauvages ont été élevés sur ces collecteurs jusqu'à une taille comprise entre 4 et 8 cm de longueur, selon une mesure dorso-ventrale de la coquille (Figure 2A).

Location	Cross details	♂	♀	N	N _E	Pa	Ar
Wild Collections							
Matautea (MAT)	Natural population			40	14.5 (8.3-22.3)	0.556 (0.242)	13.333 (1.878)
Peiriki (PEI)	Natural population			40	∞	0.667 (0.289)	14.556 (1.994)
Rikitea (RIK)	Natural population			40	23.7 (6.5-52.0)	0.444 (0.242)	13.444 (1.788)
Hatchery Cohorts							
6B17	F1, No selection	6	10	40	5.8 (3.2-9.2)	0.222 (0.147)	9.222 (0.909)
6B20	F1, Colour line	7	3	40	5.5 (4.0-7.1)	0.111 (0.111)	9.000 (0.816)
7B5	Wild & F1 cross, Colour line	14	13	40	7.5 (4.5-11.2)	0.222 (0.147)	9.778 (1.222)
6B15	F2, No selection	20	11	40	7.2 (4.2-11.1)	0.222 (0.147)	10.111 (1.184)
7B2	F2, No selection	18	22	40	8.6 (5.4-12.7)	0.000 (0.000)	9.556 (0.766)
7B4	F2, Colour line	12	11	40	9.7 (5.7-14.9)	0.111 (0.111)	10.000 (0.726)
G1	F2, Single pair mating	1	1	40	3.9 (2.4-5.7)	0.222 (0.222)	4.111 (0.389)
G2	F2, Single pair mating	1	1	40	2.5 (1.6-3.7)	0.000 (0.000)	6.111 (0.564)
G3	F2, Single pair mating	1	1	40	3.5 (1.7-6.1)	0.000 (0.000)	3.222 (0.401)

Location	He	Ho	F _{IS}	R	HWE
Wild Collections					
Matautea (MAT)	0.847 (0.029)	0.515 (0.080)	0.200	-0.035 (0.121)	*
Peiriki (PEI)	0.871 (0.020)	0.489 (0.069)	0.274	-0.070 (0.113)	*
Rikitea (RIK)	0.856 (0.025)	0.499 (0.063)	0.272	-0.050 (0.123)	*
Hatchery Cohorts					
6B17	0.754 (0.031)	0.462 (0.082)	0.173	0.106 (0.233)	
6B20	0.787 (0.022)	0.512 (0.075)	0.156	0.084 (0.234)	
7B5	0.816 (0.018)	0.527 (0.063)	0.249	0.049 (0.197)	
6B15	0.820 (0.024)	0.527 (0.071)	0.204	0.013 (0.174)	
7B2	0.818 (0.024)	0.506 (0.096)	0.215	0.027 (0.180)	
7B4	0.827 (0.019)	0.519 (0.085)	0.212	0.019 (0.179)	
G1	0.684 (0.023)	0.717 (0.093)	-0.055	0.386 (0.235)	
G2	0.711 (0.022)	0.580 (0.103)	0.097	0.264 (0.301)	
G3	0.569 (0.079)	0.622 (0.131)	-0.105	0.433 (0.237)	

Tableau 3. Données statistiques des populations de collectage et des cohortes produites en écloseries. Le nombre de mâles (♂), de femelles (♀), d'individus génotypés (N) et d'allèles privés (Pa) est indiqué, ainsi que la taille effective de la population (N_E) avec des intervalles de confiance à 95%, la richesse allélique (Ar), l'hétérozygotie attendue (He), l'hétérozygotie observée (Ho), le coefficient de consanguinité (F_{IS}), la parenté au sein de chaque population (R) et l'écart significatif par rapport à HWE à p < 0,01 au sein de populations naturelles (*).

Afin d'étudier l'évolution de la diversité génétique au sein d'une éclosérie de production, six cohortes (produites à des fins de production commerciale en cours) ont été utilisées (Tableau 3 & Figure 2D). Celles-ci étaient composées de deux cohortes F1 multi-parentales dérivées d'huîtres sauvages constituant la première génération d'éclosérie (6B17 et 6B20), de trois cohortes F2 multi-parentales créées à l'aide de géniteurs F1, formant la deuxième génération d'éclosérie (6B15, 7B2 et 7B4). Une autre cohorte a été produite à l'issue d'un croisement entre des parents sauvages et des individus d'une cohorte F1 (7B5). En outre, trois cohortes F2 issues de croisements biparentaux ont été produites à des fins expérimentales (G1, G2 et G3). Pour certaines productions, leurs parents ont été sélectionnés sur la base de la couleur de la face interne de la coquille, avec une dominante verte (appelée « ligne de couleur »), la ferme ciblant les perles de couleur verte et de couleur « peacock » (Figure 2B). Toutes les cohortes d'éclosérie ont été produites, élevées et entretenues à l'éclosérie Regahiga sur l'île de Mangareva (archipel des Gambier ; GPS 23 ° 06'55,86 "S / 134 ° 59'37,43" W) à l'aide des procédures de production décrites par ailleurs (Ky, Devaux, 2016 ; Ky *et al.*, 2015). Les tissus du manteau ont été collectés chez 40 individus choisis au hasard dans chaque cohorte d'éclosérie et stockés dans de l'éthanol absolu (99,9%) avant que l'ADN génomique soit extrait à l'aide du kit MagAttract®96 (Qiagen).

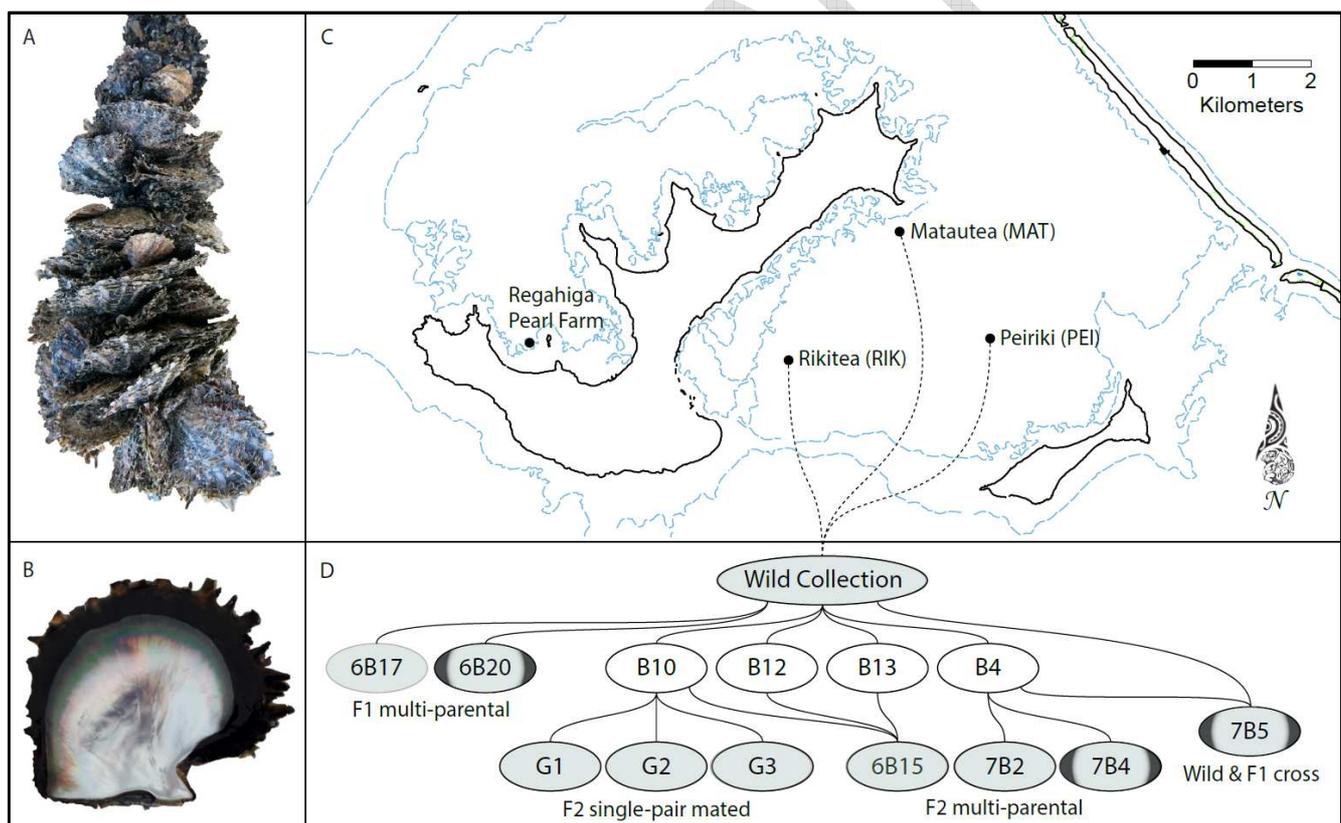


Figure 2. Résumé descriptif des huîtres et des sites de collectage naturel dans cette étude. Ceux-ci inclus; A, des individus sauvages sur collecteurs non sélectionnée; B, le phénotype de la face interne de la lignée colorée sous sélection; C, une carte du lagon de l'île de Mangareva indiquant l'emplacement des collecteurs de naissain et de la ferme perlière ; et D, une visualisation généalogique de la façon dont les cohortes d'éclosérie F1 et F2 ont été produites. Les ovales ombrés en gris indiquent les individus analysés et les ovales à bords noir foncé ceux sélectionnés dans la lignée colorée.

Tous les échantillons ont été génotypés à l'aide de neuf microsatellites couramment utilisés et développés par Herbinger *et al.* (2006). En bref, des réactions de PCR ont été réalisées en utilisant le kit Qiagen Multiplex PCR Kit (QIAGEN) dans un volume final de 10 μ L contenant 3 μ L d'ADN génomique dilué à 10ng / μ L, 5 μ L du mélange maître multiplexe de Qiagen, 1 μ L de solution Q de Qiagen, et 1 μ L d'un mélange d'amorce étiqueté. Les neuf marqueurs microsatellites ont été amplifiés en multiplexe au cours de trois PCR (tableau 2). Les PCR ont été conduites dans un thermocycleur GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems) selon le cycle suivant : une dénaturation initiale à 95°C pendant 15 minutes, 35 cycles à 95°C pendant 40 secondes, une température d'anneau pendant 90 secondes (Tableau 4) et un allongement à 72°C pendant 90 secondes et une dernière extension à 60°C pendant 30 minutes. Les fragments de PCR amplifiés ont ensuite été dilués au dixième avec de l'eau de qualité moléculaire et séparés sur un séquenceur ABI PRISM 3130xl (Applied Biosystems) avec des standards de taille de colorant GeneScan 500 Rox. Les tailles d'allèles de microsatellites ont été évaluées à l'aide du logiciel GeneMapper v4.1 (Applied Biosystems, Life Technologies). Le micro-vérificateur V2.2.3 (van Oosterhout *et al.*, 2004) a été utilisé pour détecter les erreurs de génotypage, la précision des modèles de répétition et la présence d'allèles nuls. La confirmation de l'équilibre de Hardy-Weinberg pour les populations prélevées dans la nature a été testée dans Genepop V4.2 à l'aide d'un test de probabilité exacte avec 100 lots et 10000 itérations.

Multiplex	Tm	Marker	Sequences (5' to 3')	Dyes	size range (bp)	Nb of alleles
Mix 1	56°C	Pmarg37	F-GTCAGGATCTCCTTATCTC R-AGGAGATATGTCATTGCTG	NED	145-211	34
		Pmarg44	F-GGACAGGGAATATCAAAC R-CAAATATGTGCAGTGTGA	HEX	152-240	23
		Pmarg77	F-GTTCAGCCATTCTTGAGAAG R-TGAGCAATATTTAGCTCGAAG	FAM	112-212	24
Mix 2	55°C	Pmarg2	FGATCCTACGATGATTGCTTTGTC R-TGCAACGTATCAGGTTATGTTT	HEX	165-249	39
		Pmarg11	F-TCTGTCCGTCATCTAGC R-ACAATGCATATCAAGTCAGC	NED	166-258	24
		Pmarg45	F-TCTGCCTGACAAGTTACGAAC R-ATACATTGAAGCTCGTCTCCTC	FAM	112-272	38
Mix 3	50°C	Pmarg7	F-CGTCAGTGGGAGTCAAATATTCG R-AGGAAGGGCATGTCATAAGGAAC	HEX	160-192	15
		Pmarg68	F-GTTGCTGTGAAACATAGTG R-CAGTTATGGCTGTGGACC	FAM	120-180	15
		Pmarg79	F-AGTAAGTTGTAGCCAAATATGTGC R-GGAATATCAAACACAGGTCCTC	FAM	194-262	17

Tableau 4. Les marqueurs microsatellites de *P. margaritifera* et les séquences des amorces associées, leurs conditions d'amplification et le nombre et la tailles des allèles.

Pour chaque population et chaque cohorte d'écloserie, le nombre d'allèles privés, la richesse allélique, l'hétérozygotie observée et attendue ont été calculés dans le cadre du package «diversité» dans R (Keenan *et al.*, 2013). Les coefficients de consanguinité (FIS) ont été calculés à l'aide du logiciel Arlequin v 3.5.2.2 (Excoffier *et al.*, 2005). La significativité a été testée en utilisant les intervalles de confiance fixé à 95% sur 10 000 itérations et la taille effective de la population (Ne) a été estimée à l'aide de la méthode de co-ascendance moléculaire à l'aide du logiciel Ne Estimator v2.1 (Do *et al.*, 2014). Aucune erreur de génotypage majeure due à la redondance ou à la mauvaise lecture d'allèles n'a été détectée; cependant, des allèles nuls étaient présents dans de nombreux locus au sein des populations, ce qui est couramment observé chez les mollusques marins (Hedgecock *et al.*, 2004; Herbinger *et al.*, 2006; Jones *et al.*, 2011; Lemer *et al.*, 2011 ; 2011; Li *et*

al., 2006; Zhang *et al.*, 2018). Pour ajuster la présence d'allèles nuls, des estimations de FST par paires ont été calculées dans FreeNA en utilisant la méthode de correction ENA avec 10 000 itérations (Chapuis, Estoup, 2007; Chapuis *et al.*, 2008). Pour étudier la différenciation génétique entre les populations sauvages et les cohortes d'écloseries, une visualisation DAPC multivariée a été produite à l'aide du logiciel R «adegenet» (Jombart *et al.*, 2010). Les niveaux de parenté entre individus et entre populations ont été évalués à l'aide de la méthode du maximum de vraisemblance décrite dans Wang (2007), dans le package R «lié» (Pew, *et al.*, 2015). Les différences dans les valeurs de parenté par paires au sein de chaque population ont été testées à l'aide d'une ANOVA et un test de Tukey a ensuite été utilisé comme procédure de comparaison multiple avec un risque $\alpha = 0,05$. La présence de goulots d'étranglement récents au sein des populations et des cohortes d'écloseries a été testée à l'aide du logiciel Bottleneck v1.2.02 (Piry *et al.*, 1999). Pour chaque échantillon et locus, la distribution de l'hétérozygotie attendue basée sur le nombre d'allèles observé a été calculée sous le modèle d'allèle infini (IAM) et le modèle de mutation par étapes (SMM) avec 10 000 itérations et leur signification ont été testés à l'aide du test de Wilcoxon.

3.2 Résultats

Diversité génétique

La proportion d'allèles privés varie de 0,44 à 0,66 parmi les populations sauvages. Au sein des cohortes d'écloserie, leur proportion est beaucoup plus faible, variant de 0,00 à 0,22. Une réduction similaire (de l'ordre de 26,6 à 34,7%) de la richesse allélique a également été observée dans les cohortes multiparentales d'écloserie F1 et F2, par rapport aux populations sauvages (Tableau 3). Cependant, seule une légère diminution du FIS (coefficient de consanguinité) a été observée dans les cohortes d'écloseries multiparentales F1 (0,156 - 0,173) et F2 (0,204 - 0,215) par rapport aux populations sauvages (de 0,200 à 0,274) ; avec aucune différence significative n'a été observée entre les populations sauvages et les cohortes d'écloseries multiparentales F1 et F2 (test de Wilcoxon sur paires appariées, $p > 0,01$). Pour les cohortes F2 biparentales, les réductions d'estimation de la diversité génétique sont plus justifiées : réduction de la richesse allélique de 55,7 à 76,6% ; valeurs de H_e allant de 0,569 à 0,711 ; valeurs de FIS allant de - 0,105 à 0,097 ; Tableau 3). Parallèlement à la production des générations F1 et F2 dans un système commercial, certaines cohortes produites (6B-20, 7B-4 et 7B-5) l'ont été avec des parents sélectionnés sur la couleur de la face interne de la coquille (lignée colorée). Même s'il y avait une légère réduction des paramètres de diversité génétique (proportion d'allèles privés, richesse allélique et FIS) entre les cohortes d'écloserie produites avec ou sans sélection sur les parents, ces réductions n'étaient pas significatives (test de Wilcoxon sur paires appariées, $p > 0,01$).

Relations de parenté

Les valeurs de parenté les plus faibles ont été observées dans les populations naturelles, avec une légère augmentation des cohortes F1 et F2 multi-parentales et une augmentation beaucoup plus importante pour les cohortes F2 bi-parentales (Figure 3). Il est intéressant de noter que la corrélation entre les couples observée dans les cohortes F1 multiparentales était supérieure à celle des cohortes F2 multiparentales. En outre, la variance dans les estimations de parenté a également augmenté de la même façon. Des différences significatives dans les valeurs de parenté moyennes ont été observées entre les trois populations sauvages et toutes les autres cohortes d'écloseries (Figure 3). Il y avait également des différences significatives dans les valeurs de parenté moyennes des cohortes multiparentales F1 (6B17 et 6B20) et des cohortes F2 biparentales (G1, G2 et G3) par rapport à

toutes les autres cohortes. Il est intéressant de noter qu'il n'y a pas de tendance cohérente entre les valeurs de parenté moyennes des cohortes sélectionnées pour la couleur de la coquille et celles qui ne le sont pas.

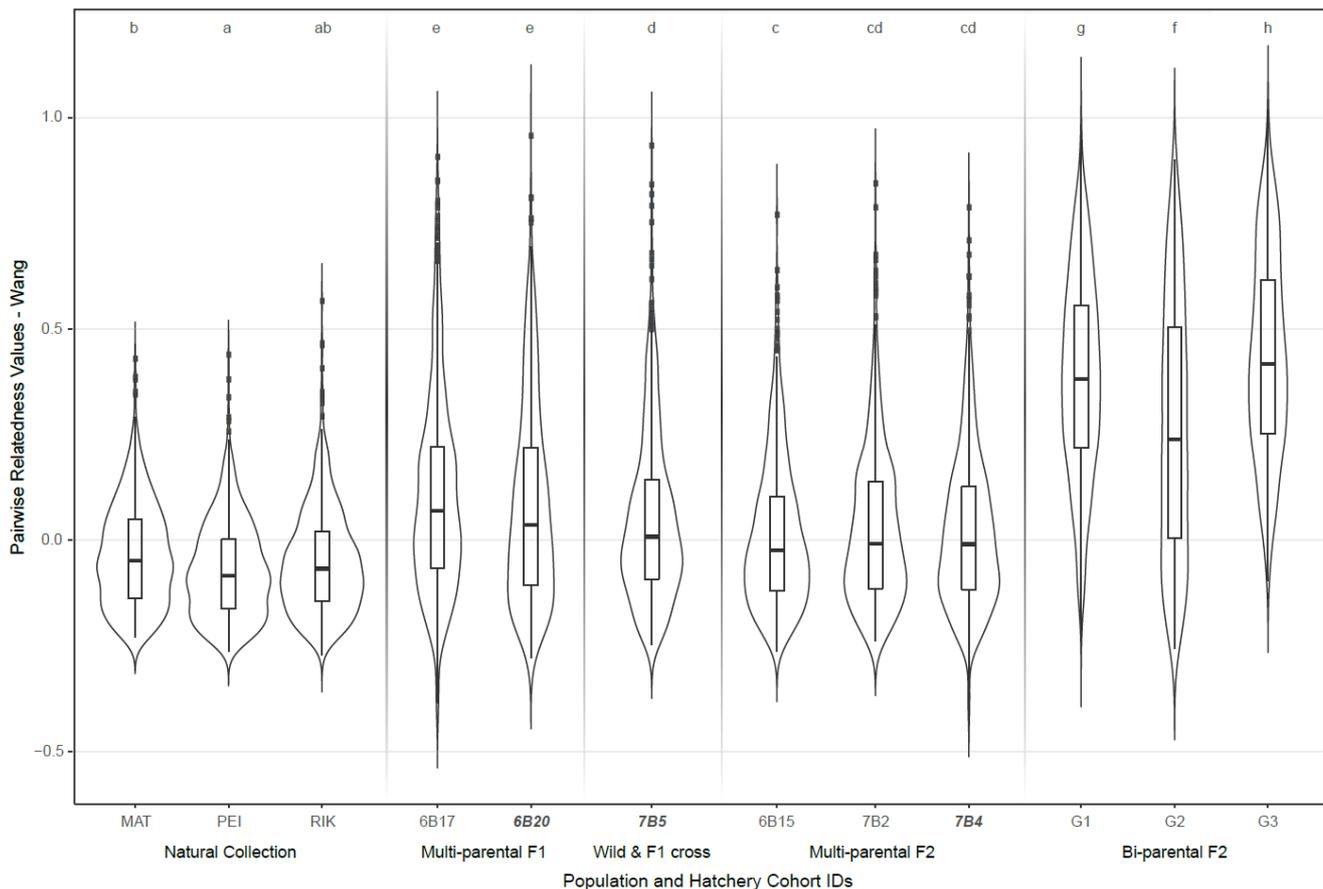


Figure 3. Répartition des valeurs de parenté par paires entre les populations naturelles et les cohortes d'écloseries. Les boîtes à moustaches représentant la moyenne, les quartiles et les valeurs aberrantes sont présentées dans les distributions de densité pour chaque groupe. Les différences significatives (ANOVA et test de Tukey avec $\alpha = 0,05$) entre les groupes sont indiquées par des groupes de lettres. Les étiquettes en gras des cohortes indiquent que leurs parents ont été sélectionnés pour la couleur de la face interne de la coquille.

Ne et goulot d'étranglement

La taille effective de la population des échantillons sauvages varie de 14,5 à 23,7, avec le site Peiriki donnant une estimation à l'infini, probablement attribuée à de larges intervalles de confiance (Tableau 3). Une réduction substantielle de la taille effective de la population a été observée parmi les populations sauvages jusqu'aux cohortes multiparentales F1 (69,6 - 71,2%) et F2 (49,2 - 62,3%), avec une chute plus prononcée des cohortes F2 biparentales (79,6 - 86,9%). La taille effective estimée de la population est fortement corrélée au nombre de contributeurs pour chaque cohorte d'écloserie ($r^2 = 0,76$) et en moyenne, la taille effective de la population était de 68,5% du nombre de contributeurs. Toutes les populations et les cohortes ont subi un goulot d'étranglement récent basé sur l'IAM, alors que seules 6B17, G1 et G3 sont significatives dans le cadre du MGS (Tableau 5).

Population	Mean N	Mean k	Mean He	<i>p</i> W_2t_IAM	<i>p</i> W_2t_SMM
Wild Collections					
Matautea	76.67	13.33	0.8580	<i>0.0020</i>	0.4961
Peiriki	73.11	14.56	0.8829	<i>0.0020</i>	0.8203
Rikitea	71.56	13.44	0.8685	<i>0.0020</i>	0.7344
Hatchery Cohorts					
6B17	74.67	9.22	0.7641	<i>0.0195</i>	<i>0.0059</i>
6B20	71.11	9.00	0.7981	<i>0.0039</i>	0.1289
7B5	73.33	9.78	0.8278	<i>0.0020</i>	0.7344
6B15	75.11	10.11	0.8316	<i>0.0020</i>	1.0000
7B2	77.11	9.56	0.8288	<i>0.0039</i>	0.2500
7B4	76.22	10.00	0.8384	<i>0.0020</i>	0.7344
G1	76.67	4.11	0.6931	<i>0.0020</i>	<i>0.0059</i>
G2	75.56	6.11	0.7209	<i>0.0039</i>	0.9102
G3	75.11	3.22	0.5759	<i>0.0039</i>	<i>0.0078</i>

Tableau 5. Test d'écart à l'équilibre de mutation pour les populations naturelles et les cohortes d'éclosion de *P. margaritifera*. Les nombres en italiques représentent une différence significative ($p < 0,05$).

Différenciation génétique des populations

Même si la différenciation génétique observée entre les populations naturelles et les cohortes F1 était relativement faible (valeurs de FST comprises entre 0,005 et 0,074), toutes les comparaisons par paires étaient significatives ($p < 0,01$), sauf pour les sites RIK vs. MAT, RIK vs. PEI et 7B2 vs. 7B4 (Tableau 6). La différenciation par paires était plus prononcée dans les cohortes F2 biparentales, en particulier G1 et G3, par rapport aux cohortes F2 ou aux populations naturelles (valeurs FST comprises entre 0,076 et 0,190). Une analyse similaire a été observée dans l'analyse DAPC dans laquelle la plupart des populations et des cohortes se regroupent, seules les cohortes F2 biparentales G1, G2 et G3 étant séparées par les deux premières valeurs propres (Figure 4).

	Matautea	Peiriki	Rikitea	6B17	6B20	7B5	6B15	7B2	7B4	G1	G2	G3
Matautea												
Peiriki	0.005*											
Rikitea	<i>0.004</i>	<i>0.003</i>										
6B17	0.032*	0.036*	0.039*									
6B20	0.038*	0.037*	0.032*	0.074*								
7B5	0.025*	0.031*	0.029*	0.059*	0.053*							
6B15	0.020*	0.020*	0.030*	0.049*	0.061*	0.037*						
7B2	0.025*	0.025*	0.036*	0.070*	0.057*	0.048*	0.038*					
7B4	0.024*	0.023*	0.034*	0.069*	0.056*	0.045*	0.035*	-0.010				
G1	0.125*	0.121*	0.124*	0.168*	0.150*	0.131*	0.121*	0.134*	0.134*			
G2	0.079*	0.076*	0.086*	0.107*	0.109*	0.086*	0.077*	0.082*	0.079*	0.158*		
G3	0.146*	0.138*	0.156*	0.190*	0.183*	0.148*	0.120*	0.125*	0.117*	0.182*	0.178*	

Tableau 6. FST par paires entre populations naturelles et cohortes d'écloseries. Un * indique une significativité à $p < 0,05$.

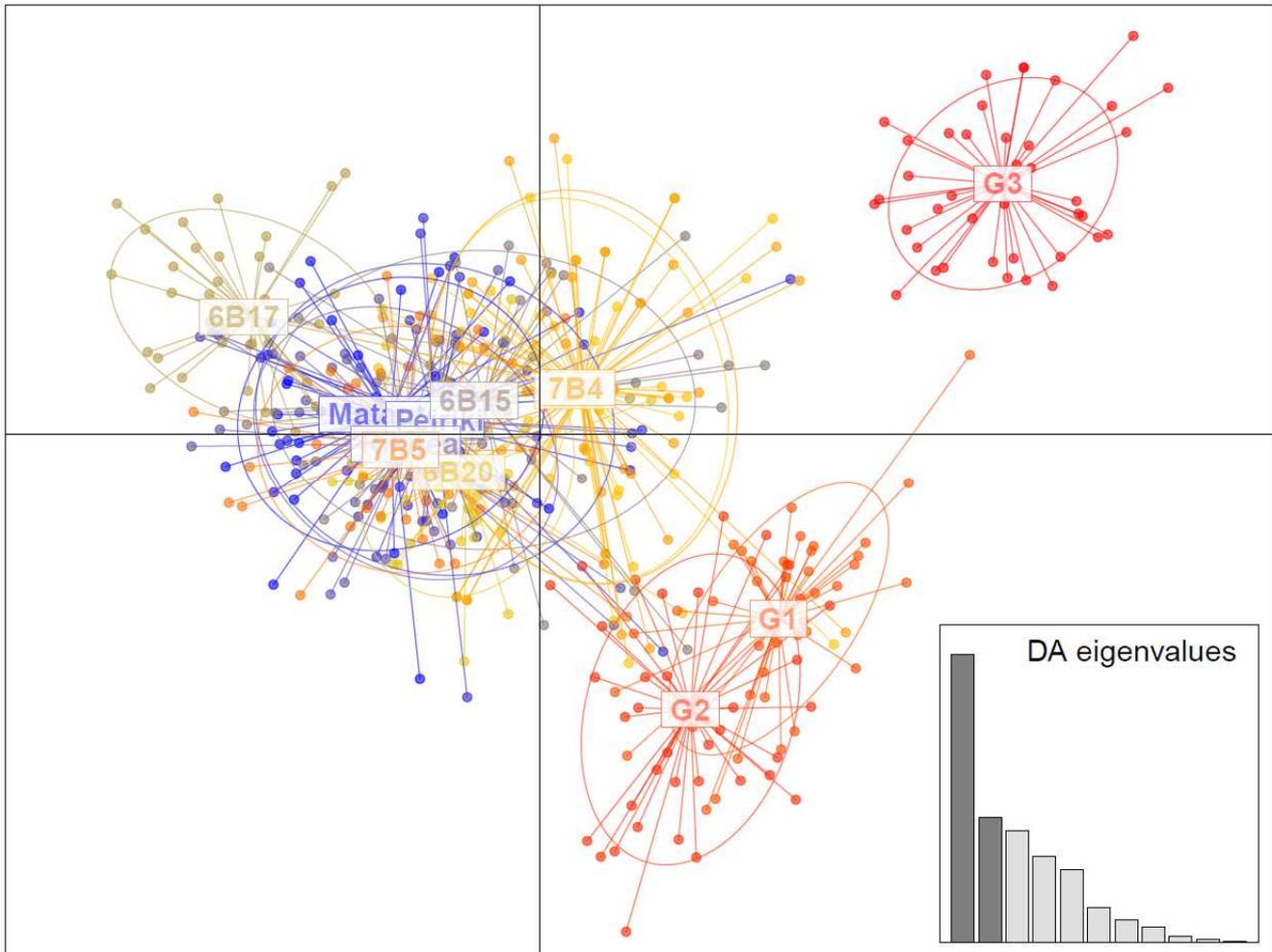


Figure 4. Visualisation DAPC de la différenciation génétique entre populations naturelles et cohortes d'écloséries.

3.3 Discussion

Le développement d'un programme avancé d'amélioration génétique sélective de *P. margaritifera* en Polynésie française est un objectif poursuivi par plusieurs producteurs locaux. L'unicité de la diversité génétique et phénotypique au sein du lagon isolée de Mangareva en fait un système unique pour l'exploration du potentiel de production génétique, d'autant plus que l'importation de matériel génétique provenant d'ailleurs est interdite (hors cadre de recherche). Grâce à l'amélioration des protocoles d'éclosion, à la mise au point de techniques de gestion optimisées et au suivi de la diversité génétique, l'élaboration d'un programme avancé d'élevage sélectif est prometteuse au sein d'un tel système géographique.

Diversité initiale des populations sauvages collectées

Les mesures de la diversité génétique au sein des populations sauvages issues du collectage naturelles étaient relativement élevées (proportion d'allèles privés allant de 0,444 à 0,556, richesse allélique de 13,3 à 14,6 et FIS de 0,20 à 0,27). Cependant, la taille effective de la population estimée était modérément faible (de 14,5 - 23,7). Étant donné que ces trois populations sauvages ont été

échantillonnées au cours de la même période (octobre à décembre 2016), la faible taille de la population effective peut être due à des impulsions de recrutement sélectif, à des succès de reproduction et à une capacité de survie larvaires/ juvéniles variables, couramment observés chez les bivalves marins (Boudry, 2009 ; Boudry *et al.* 2009, 2002 ; Hedgecock, 1994 ; Li, Hedgecock, 1998). Par conséquent, la diversité génétique représentée au sein des animaux sauvages collectés peut ne représenter qu'une partie de la population adulte naturelle dans la lagune. Dans une perspective de reproduction sélective, il convient de maximiser la diversité génétique initiale au sein du stock fondateur d'une lignée d'écloserie. Cet objectif pourrait être atteint en rassemblant des individus provenant de sites supplémentaires dans l'archipel des Gambier, mais également sur des points de temps successifs, afin de réduire la contribution disproportionnée des huîtres reproductrices à ce point de temps. La collecte d'adultes sauvages viendrait également compléter la diversité génétique pouvant être utilisée au sein des populations de reproduction initiales. Cela permettrait également de réduire la parenté entre les huîtres collectées dans la nature.

La capture de la diversité de la population sauvage au sein des cohortes F1

En plus de réduire la variation génétique observée au sein des populations prélevées dans la nature, la variance élevée du succès de reproduction peut également réduire la variance génétique capturée au cours des générations suivantes en écloserie. Par exemple, la taille effective des populations F1 et F2 était respectivement de 49,2 à 71,2% inférieure à celle des populations prélevées dans la nature, avec donc une augmentation de la parenté et une diminution observée du coefficient de consanguinité et de la richesse allélique. Des résultats similaires ont été rapportés dans les cohortes d'écloserie d'autres mollusques, dont *Crassostrea gigas* (Zhang *et al.*, 2018), l'ormeau *Haliotis midae* (Rhode, et 2014) et l'huître perlière aux lèvres argentées (Lind *et al.*, 2009). Dans tous les cas, la diversité génétique plus élevée observée au sein des populations sauvages par rapport aux cohortes d'écloserie reflète les procédures de sélection des géniteurs et indique qu'il est possible d'accroître la diversité génétique capturée au sein des cohortes d'écloseries, surtout si le succès de reproduction est élevé.

Il a été démontré que les estimations de la taille effective d'une population étaient plus efficaces pour jauger les informations génétiques au sein d'une petite population sélectionnée que l'analyse de paramètres génétiques tels que l'hétérozygotie observée et attendue (Consuegra *et al.*, 2005; Zhang, *et al.*, 1991, 2018). Dans cette étude, les estimations de la taille effective de la population sont corrélées au nombre de contributeurs parentaux pour chaque cohorte d'écloseries et diminuent des populations prélevées dans la nature aux cohortes multi-parentales d'écloseries. Cependant, la variance relative des estimations de la taille effective de la population était relativement grande. Le déclin de N_e a déjà été documenté chez les huîtres (Appleyard, Ward, 2006 ; Lallias *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2018). Les diminutions de N_e parmi les générations suivantes sont généralement attribuées à la sélection involontaire de la meilleure progéniture produite par seulement quelques parents, à la reproduction asymétrique, au sex ratio inégal des parents et/ ou au succès reproducteur et aux taux de survie différentiels (Appleyard, Ward, 2006 ; Boudry *et al.*, 2002; Goyard *et al.*, 2003; Lallias *et al.*, 2010). Dans notre cas, cette réduction de N_e est probablement attribuée au faible nombre de parents et à l'inégalité des sex-ratios, ce qui est le plus important dans les cohortes F1 multi-parentales. Ceci est également corroboré par la détection de goulots d'étranglement récents dans toutes les populations et toutes les cohortes. Des études complémentaires sur un plus grand nombre de permettrait de déterminer si une réduction de N_e est présente et si elle peut être attribuée aux différences de degré de parenté entre les géniteurs parentaux ou à la perte de représentation de la famille au cours de l'élevage des cohortes.

Rétention de la diversité génétique capturée au sein des populations d'écloserie suivantes.

Après la capture initiale de la diversité génétique au sein d'une génération F1, il est important d'assurer le maintien de cette variabilité au cours des générations suivantes. Dans cette étude, aucune réduction significative des paramètres de diversité génétique n'a été observée entre les cohortes F1 et F2 multi-parentales. En effet, les cohortes F2 avaient une taille effective de population, une richesse allélique, une hétérozygotie observées et attendues, un coefficient de consanguinité et une parenté inférieure plus élevés ; ce qui indique qu'elles sont plus diverses que les cohortes F1 échantillonnées. Étant donné que la F2 ne provient pas directement des individus F1, ceci peut être attribué à la variance dans la production de cohortes au sein du système de production commercial. Toutefois, cela est probablement dû au nombre de parents sélectionnés pour produire chaque cohorte. La production des cohortes F1 multi-parentales échantillonnées ne comprenait que 10 à 16 parents chacune, par rapport aux cohortes F2 multi-parentales dans lesquelles 23 à 40 parents ont été utilisés. Là encore, cela renforce l'idée selon laquelle le nombre initial d'individus en croisement doit être maximisées. Même s'il y avait quelques différences entre les cohortes F1 et F2 multi-parentales, aucune différence significative prononcée entre les cohortes sélectionnées et non sélectionnées n'a été observée dans cette étude. L'absence de différences dans les indices de diversité génétique entre les cohortes F1 et F2 sélectionnées et non sélectionnées pourrait être attribuée au faible nombre de contributeurs parentaux. On pourrait s'attendre à ce que, si davantage de parents étaient utilisés dans la production de cohortes (c'est-à-dire 100 à 150), la réduction de la diversité génétique résultant de la sélection deviendrait plus évidente.

Structure génétique.

L'estimation par paire de FST indique qu'il y a des différences significatives entre la plupart des populations de collectage et les cohortes d'écloserie, bien que leurs valeurs soient très faibles (de 0,005 à 0,074). Ceci est pris en charge dans l'analyse DAPC selon laquelle seules les cohortes biparentales se séparent du cluster principal. Peu de différences génétiques significatives entre les populations prélevées dans la nature, au regard des valeurs comparativement élevées de la FIS au sein de chaque population (de 0,20 à 0,27), indique qu'une grande partie de la variation est observée au sein des populations plutôt qu'entre les populations. En effet, seul un stock génétique d'huîtres sauvages a été échantillonné. L'exploration de différents sites de l'archipel Gambier, l'utilisation de collecteurs à différents moments et l'échantillonnage de différentes populations adultes sont nécessaires pour étudier la diversité génétique globale et maximale disponible pouvant être utilisée comme stock source et fondateur pour un programme de reproduction sélectif.

La très faible différenciation entre les populations sauvages de collectage et les cohortes multi-parentales suggère qu'il n'y a pas d'obstacle évident à l'échange de gènes tout au long du processus de sélection par voie d'écloseries, qui aurait pu être apparent si des événements de mortalité différentielles élevés se seraient produits au cours des élevages (Zhang, et al., 2018).

Perspectives de gestion future des populations d'écloseries dans l'archipel Gambier.

Dans de nombreux systèmes d'écloseries d'espèces à grande fécondité, la fermeture du cycle de vie (domestication), le maintien du pedigree, l'égalisation du sex-ratio des parents et l'utilisation de marqueurs génétiques pour surveiller la diversité génétique au cours des générations sont devenus courants (Dégremont *et al.*, 2015 ; Gjedrem, Robinson, 2014 ; Gjedrem, Rye, 2018 ; Guppy *et al.*, 2018; Robledo *et al.*, 2018). Cette gestion en écloserie garantit le maintien de la diversité génétique et de la taille effective des populations, tout en réduisant le niveau de consanguinité tout au long de la production. La production en écloserie à Mangareva se déroule de façon très satisfaisante depuis

quelques générations. Cependant, la production durable à long terme d'une filière d'écloserie sélectionnée nécessiterait l'apport d'une population source plus importante, représentant la diversité maximale disponible dans l'archipel, une augmentation du nombre de parents utilisés par cohorte et la standardisation des sex-ratios des parents contribuant aux cohortes. Le futur croisement des cohortes F1 et F2 pourrait également être entrepris pour maintenir la diversité génétique existante déjà capturée dans l'écloserie.

Etant donné que l'introduction ou le croisement de plusieurs lignées à partir d'endroits géographiques en dehors de l'archipel Gambier n'est pas une option retenue pour accroître la diversité génétique initiale, il est important de veiller à ce qu'une diversité génétique maximale au sein de l'archipel des Gambier soit exploitée au sein de la population source, mais qu'elle soit également conservée au fil des générations suivantes. Une option pour atteindre cet objectif pourrait être de compléter les cohortes familiales existantes avec des lignées sélectionnées en masse parmi une diversité génétique plus large au sein de l'archipel des Gambier. On s'attendrait à ce que ces changements satisfassent aux restrictions imposées à la population source d'huîtres, mais devraient également maximiser la diversité disponible et utiliser les installations d'écloserie existantes. Une fois que les cohortes produites utilisant un plus grand nombre de contributeurs sont disponibles, une exploration plus approfondie de l'intensité de la sélection et de la perte de diversité génétique pourrait être entreprise afin de donner plus d'indications sur la mise en place d'un programme de sélection génétique durable à long terme.

Une réflexion sera menée courant 2018, du fait de la connaissance de plus en plus approfondie de la séquence de l'ADN de *P. margaritifera* (génome en cours d'assemblage dans le cadre d'AmeliGEN). Un nouveau type de marqueurs pourrait être utilisé : ce sont les SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*). Il s'agit de la variation bi-allélique d'une seule base de l'ADN. On pense que chez les mammifères, on peut en trouver toutes les 500 ou 1000 paires de bases. En comparaison, on trouve un SSR tous les 25 à 100 kb seulement. Sachant que les SNP sont co-dominants indemnes d'allèles nuls et que leur révélation peut se faire en routine en très grand nombre (40 000 points ou plus), ce type de marqueur a maintenant tendance à prévaloir.

4. Interactions génotype x environnement

L'objectif de l'étude est d'évaluer les effets de deux environnements contrastés (Gambier vs. Tuamotu) sur les caractères de production et les réponses thermorégulatrices des lots d'huîtres perlières étudiés originaires des Gambier. L'année 2017 étant marquée par la démission (en février 2017) de la doctorante positionnée sur cette présente convention (Mme F. TESSIOT, 1ère inscription universitaire fin 2016 et salarié de la SCA Regahiga), un décalage de cette action aura lieu. Les lots F2 ciblés sont ceux produits fin 2017. Ils seront exploités en greffes expérimentales fin 2019, et les récoltes correspondantes (18 mois de culture *a minima* aux Gambier) auront lieu hors convention dans le cadre d'un projet à définir (récoltes associées fin 2021).

5. Analyse du transcriptome

Deux phénotypes ont été sélectionnés pour les analyses du transcriptome. Il s'agit : 1) des queues (QL) et têtes de lots (TL) au sein d'une famille F2 (biparentale) produite fin janvier 2017 à partir d'individus G1 de deux ans d'âge, et 2) des individus de chair orange (phénotype ORA) produite en éclosion.

Pour le phénotype QL/ TL, l'action repose sur des analyses d'expression différentielle de transcrits entre individus de phénotypes différents en taille à partir de biomarqueurs de la biominéralisation développés par C. Joubert. Cette étude préliminaire permettra d'orienter à l'avenir la possibilité d'une sélection génétique à l'aide de marqueurs prédictifs.

Pour le phénotype ORA, il s'agissait d'évaluer et d'identifier les gènes clefs potentiellement impliqués dans l'expression de la mutation de chair (les individus sauvages S présentant une chair noire). Cette action repose aussi sur une analyse d'expression différentielle des transcrits entre individus de phénotypes différents à partir de la banque SSH développées par S. Lemer (2015). Cette étude préliminaire permettra d'orienter à l'avenir la possibilité d'une sélection génétique à l'aide de marqueurs prédictifs.

Le rapport intermédiaire #1 (2017) expose les sections matériels et méthodes et résultats en détail. L'année 2018 a consisté à les valoriser sous forme de 2 publications :

- Phénotype QL/ TL : valorisation des résultats dans le cadre de la publication figurant en annexe, Titre : Donor and recipient contribution to phenotypic traits and the expression of biomineralisation genes in the pearl oyster model *Pinctada margaritifera* (Scientific Reports).
- Phénotype ORA : valorisation sous forme de publication en cours de révision. Titre : Relationship of the orange tissue morphotype with shell and pearl colouration in the mollusc *Pinctada margaritifera* (Scientific Reports).

6. References

- Appleyard, S.A., Ward, R.D., 2006. Genetic diversity and effective population size in mass selection lines of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture*. 254, 148-159.
- Arnaud-Haond, S., Vonau, V., Bonhomme, F., Boudry, P., Blanc, F., Prou, J., Seaman, T., Goyard, E., 2004. Spatio-temporal variation in the genetic composition of wild populations of pearl oyster (*Pinctada margaritifera cumingii*) in French Polynesia following 10 years of juvenile translocation. *Molecular Ecology*. 13, 2001-2007.
- Boudry, P., 2009. Genetic variation and selective breeding in hatchery propagated molluscan shellfish. *New technologies in aquaculture: Improving production efficiency, quality and environmental management* Woodhead Publishing Limited, Cambridge, UK, 87-108.
- Boudry, P., Collet, B., Cornette, F., Hervouet, V., Bonhomme, F., 2002. High variance in reproductive success of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*, Thunberg) revealed by microsatellite-based parentage analysis of multifactorial crosses. *Aquaculture*. 204, 283-296.
- Chapuis, M.-P., Estoup, A., 2007. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution*. 24, 621-631.
- Chapuis, M.P., Lecoq, M., Michalakis, Y., Loiseau, A., Sword, G.A., Piry, S., Estoup, A., 2008. Do outbreaks affect genetic population structure? A worldwide survey in *Locusta migratoria*, a pest plagued by microsatellite null alleles. *Molecular Ecology*. 17, 3640-3653.
- Consuegra, S., Verspoor, E., Knox, D., De Leániz, C.G., 2005. Asymmetric gene flow and the evolutionary maintenance of genetic diversity in small, peripheral Atlantic salmon populations. *Conservation Genetics*. 6, 823-842.
- Dégremont, L., Garcia, C., Allen, S.K., 2015. Genetic improvement for disease resistance in oysters: A review. *Journal of Invertebrate Pathology*. 131, 226-241.
- Do, C., Waples, R.S., Peel, D., Macbeth, G.M., Tillett, B.J., Ovenden, J.R., 2014. NeEstimator v2: re-implementation of software for the estimation of contemporary effective population size (N_e) from genetic data. *Molecular Ecology Resources*. 14, 209-214.
- Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S., 2005. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*. 1, 47-50.
- Gjedrem, T., Robinson, N., 2014. Advances by selective breeding for aquatic species: a review. *Agricultural Sciences*. 5, 1152.
- Gjedrem, T., Rye, M., 2018. Selection response in fish and shellfish: a review. *Reviews in Aquaculture*. 10, 168-179.
- Goyard, E., Arnaud-Haond, S., Vonau, V., Bishoff, V., Mouchel, O., Pham, D., Wyban, J., Boudry, P., 2003. Residual genetic variability in domesticated populations of the Pacific blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) of New Caledonia, French Polynesia and Hawaii and some management recommendations. *Aquatic Living Resources*. 16, 501-508.
- Guppy, J.L., Jones, D.B., Jerry, D.R., Wade, N.M., Raadsma, H.W., Huerlimann, R., Zenger, K.R., 2018. The state of 'omics' research for farmed penaeids: advances in research and impediments to industry utilisation. *Frontiers in Genetics*. 9, 282.
- Hedgecock, D., 1994. Does variance in reproductive success limit effective population sizes of marine organisms. *Genetics and evolution of aquatic organisms*. 122.
- Hedgecock, D., Li, G., Hubert, S., Bucklin, K., Ribes, V., 2004. Widespread null alleles and poor cross-species amplification of microsatellite DNA loci cloned from the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Journal of Shellfish Research*. 23, 379-386.
- Herbinger, C.M., Smith, C.A., Langy, S., 2006. Development and characterization of novel tetra- and dinucleotide microsatellite markers for the French Polynesia black-lipped pearl oyster, *Pinctada margaritifera*. *Molecular Ecology Notes*. 6, 107-109.

- In, V.-V., O'Connor, W., Dove, M., Knibb, W., 2016. Can genetic diversity be maintained across multiple mass selection lines of Sydney rock oyster, *Saccostrea glomerata*, despite loss within each? *Aquaculture*. 454, 210-216.
- Jombart, T., Devillard, S., Balloux, F., 2010. Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genetics*. 11, 94.
- Jones, D.B., Zenger, K.R., Jerry, D.R., 2011. In silico whole-genome EST analysis reveals 2322 novel microsatellites for the silver-lipped pearl oyster, *Pinctada maxima*. *Marine Genomics*. 4, 287-290.
- Keenan, K., McGinnity, P., Cross, T.F., Crozier, W.W., Prodöhl, P.A., 2013. diveRcity: An R package for the estimation and exploration of population genetics parameters and their associated errors. *Methods in Ecology and Evolution*. 4, 782-788.
- Knibb, W., Whatmore, P., Lamont, R., Quinn, J., Powell, D., Elizur, A., Anderson, T., Remilton, C., Nguyen, N.H., 2014. Can genetic diversity be maintained in long term mass selected populations without pedigree information?—A case study using banana shrimp *Fenneropenaeus merguensis*. *Aquaculture*. 428, 71-78.
- Ky, C.-L., Devaux, D., 2016. Polynesian pearls. *Hatchery international*. 17.
- Ky, C.-L., Lau, C., Koua, M.S., Lo, C., 2015. Growth performance comparison of *Pinctada margaritifera* juveniles produced by thermal shock or gonad scarification spawning procedures. *Journal of Shellfish Research*. 34, 811-817.
- Lallias, D., Boudry, P., Lapègue, S., King, J.W., Beaumont, A.R., 2010. Strategies for the retention of high genetic variability in European flat oyster (*Ostrea edulis*) restoration programmes. *Conservation Genetics*. 11, 1899-1910.
- LEMER, S., PLANES, S., 2012. Translocation of wild populations: conservation implications for the genetic diversity of the black-lipped pearl oyster *Pinctada margaritifera*. *Molecular Ecology*. 21, 2949-2962.
- Lemer, S., Planes, S., 2014. Effects of habitat fragmentation on the genetic structure and connectivity of the black-lipped pearl oyster *Pinctada margaritifera* populations in French Polynesia. *Marine Biology*. 161, 2035-2049.
- Lemer, S., Rochel, E., Planes, S., 2011. Correction method for null alleles in species with variable microsatellite flanking regions, a case study of the black-lipped pearl oyster *Pinctada margaritifera*. *Journal of Heredity*. 102, 243-246.
- Li, G., Hedgecock, D., 1998. Genetic heterogeneity, detected by PCR-SSCP, among samples of larval Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) supports the hypothesis of large variance in reproductive success. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 55, 1025-1033.
- Li, Q., Yu, H., Yu, R., 2006. Genetic variability assessed by microsatellites in cultured populations of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in China. *Aquaculture*. 259, 95-102.
- Lind, C.E., Evans, B.S., Knauer, J., Taylor, J.J.U., Jerry, D.R., 2009. Decreased genetic diversity and a reduced effective population size in cultured silver-lipped pearl oysters (*Pinctada maxima*). *Aquaculture*. 286, 12-19.
- Loughnan, S.R., Domingos, J.A., Smith-Keune, C., Forrester, J.P., Jerry, D.R., Beheregaray, L.B., Robinson, N.A., 2013. Broodstock contribution after mass spawning and size grading in barramundi (*Lates calcarifer*, Bloch). *Aquaculture*. 404, 139-149.
- Pew, J., Muir, P.H., Wang, J., Frasier, T.R., 2015. related: an R package for analysing pairwise relatedness from codominant molecular markers. *Molecular Ecology Resources*. 15, 557-561.
- Piry, S., Luikart, G., Cornuet, J., 1999. BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *Journal of heredity*. 90, 502-503.
- Rhode, C., Maduna, S.N., Roodt-Wilding, R., Bester-van der Merwe, A.E., 2014. Comparison of population genetic estimates amongst wild, F 1 and F 2 cultured abalone (*Haliotis midae*). *Animal genetics*. 45, 456-459.
- Robledo, D., Palaokostas, C., Bargelloni, L., Martínez, P., Houston, R., 2018. Applications of genotyping by sequencing in aquaculture breeding and genetics. *Reviews in Aquaculture*. 10, 670-682.

- Van Oosterhout, C., Hutchinson, W.F., Wills, D.P.M., Shipley, P., 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*. 4, 535-538.
- Vela Aitúa, S., Montaldo, H.H., Márquez Valdelamar, L., Campos Montes, G.R., Castillo Juárez, H., 2013. Decline of genetic variability in a captive population of Pacific white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* using microsatellite and pedigree information. *Electronic Journal of Biotechnology*. 16, 9-9.
- Wang, X., Li, Q., Yu, H., Kong, L., 2016. Genetic variation assessed with microsatellites in mass selection lines of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in China. *Journal of Ocean University of China*. 15, 1039-1045.
- Wang, Y., 2007. On fast computation of the non-parametric maximum likelihood estimate of a mixing distribution. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Statistical Methodology)*. 69, 185-198.
- Zhang, J., Li, Q., Wang, Q., Cong, R., Ge, J., Kong, L., 2018. The impact of successive mass selection on population genetic structure in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) revealed by microsatellite markers. *Aquacult Int*. 26, 113-125.

CONFIDENTIEL

Annexe

CONFIDENTIEL

SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

Donor and recipient contribution to phenotypic traits and the expression of biomineralisation genes in the pearl oyster model *Pinctada margaritifera*

Carole Blay^{1,2,3}, Serge Planes^{2,3} & Chin-Long KY^{1,3}

Grafting associates two distinct genotypes, each of which maintains its own genetic identity throughout the life of the grafted organism. Grafting technology is well documented in the plant kingdom, but much less so in animals. The pearl oyster, *Pinctada margaritifera*, produces valuable pearls as a result of the biomineralisation process of a mantle graft from a donor inserted together with a nucleus into the gonad of a recipient oyster. To explore the respective roles of donor and recipient in pearl formation, a uniform experimental graft was designed using donor and recipient oysters monitored for their growth traits. At the same time, phenotypic parameters corresponding to pearl size and quality traits were recorded. Phenotypic interaction analysis demonstrated: 1) a positive correlation between recipient shell biometric parameters and pearl size, 2) an individual donor effect on cultured pearl quality traits. Furthermore, the expressions of biomineralisation biomarkers encoding proteins in the aragonite or prismatic layer showed: 1) higher gene expression levels of aragonite-related genes in the large donor phenotype in the graft tissue, and 2) correlation of gene expression in the pearl sac tissue with pearl quality traits and recipient biometric parameters. These results emphasize that pearl size is mainly driven by the recipient and that pearl quality traits are mainly driven by the donor.

From a genetic point of view, grafting creates a chimera of a single individual made up of genetic material issued from two (or more) distinct genomes, with each genome maintaining its own distinct genetic identity throughout the life of the grafted organism. Typically, grafting associates two tissues from different individuals, the recipient and graft, which form vascular connections and survive as a genetic chimera due to a unique symbiotic relationship¹. The partners in a graft are known as the scion and root in plants and the donor and recipient in pearl oysters. The use of grafting technology in both plant cultivation and pearl production provides a means of improving quality in these industries. Grafting is a well-established practice that has many horticultural and biological uses. The numerous applications of plant grafting include vegetative propagation, avoidance of juvenility, cultivar change, creation of unusual growth forms, repair, size control, biotic and abiotic stress resistance and physiological improvement¹. Some studies have examined the contribution of the scion; for example, a scion of a red-flowering rose grafted on a white rose stock will continue to produce red roses¹. Grafting is commonly employed in agronomy to indirectly manipulate scion phenotype². As for the host organism, rootstocks are commonly used to propagate selected scions to improve fruit tree tolerance to environmental stress, and to control tree size^{3,4}. Roots anchor plants in the ground to provide water and nutrients from the soil and can serve as storage organs. The root system is a crucial component in coordinating response to a range of abiotic and biotic stressors^{5,6}. The influence of rootstocks on yield productivity is being increasingly recognized to be as important

¹Ifremer, UMR EIO241, Labex Corail, Centre du Pacifique, BP 49, Taravao, 98719, Tahiti, French Polynesia. ²PSL Research University, EPHE-UPVD-CNRS, USR 3278 CRIOBE, Université de Perpignan, 52 Avenue Paul Alduy, 66860, Perpignan, Cedex, France. ³Laboratoire d'Excellence "CORAIL", 52 Avenue Paul Alduy, 66860, Perpignan, Cedex, France. Correspondence and requests for materials should be addressed to C.-L.K. (email: chinky@ifremer.fr)

	QL	Medium	TL
N	393	850	292
Mean	2.51	3.60	4.68
(±SD)	(±0.44)	(±0.32)	(±0.39)
Minimum	1.17	3.03	4.06
Maximum	3.01	4.04	5.82

Table 1. *Pinctada margaritifera* juvenile (N = 1535) shell diameter summary data. Values below 3 cm correspond to the QL phenotype group (n = 393) and values above 4 cm correspond to the TL phenotype group (n = 292).

as grafted scions. In the plant system, the genetic characteristics of the root appear to drive vegetative growth and the overall growth of the grafted system depending on environmental conditions⁷.

In the pearl oyster grafting process (*Pinctada* sp.), similarities to the scion–root system were suggested by studies on the contributions of the recipient and donor to the expression of the overall phenotype (including cultured pearl quality traits). In *Pinctada maxima*, results indicated low donor-related heritability of pearl size⁸, and xenografts between *P. maxima* and *P. margaritifera* demonstrated that individual donors significantly influence the color and the surface complexion of the pearl⁹. In *P. margaritifera*, one study demonstrated the differential influence of individual donors with black or red outer shell phenotypes, combined with green or yellow inner shell phenotypes, on pearl darkness level, color categories and luster¹⁰. Another study examined the phenotypic correlation between recipient shell weight and size of pearls in *P. fucata*, revealing a limited positive relationship whereby recipient oysters with heavier shells produced bigger pearls¹¹. These results indicate potential underlying genetic correlations between the recipient or donor growth and pearl size, whereby selection for faster growing oysters might further improve pearl size.

In order to understand the rootstock–scion interaction, some reviews have investigated physiological and biochemical aspects¹², or hormonal signaling¹³. In pearl oysters, earlier studies have examined the influence of genetics, environmental factors and their interactions on pearl quantitative and qualitative traits¹⁴. A study in *P. maxima* indicated that characteristics of both donors and hosts were correlated with pearl traits¹⁵. In *P. margaritifera*, one such study demonstrated the influence of grow-out sites on cultured pearl quality traits over a broad geographic scale between archipelagos in the South Pacific¹⁶. Another analyzed environmental influence on pearl size parameters in relation to the recipient oyster biometric parameters¹⁷. Although it is clear from these studies that both donor and recipient oysters are involved in pearl formation in *P. margaritifera*, the relative contributions have not yet been clearly identified. Despite much study on pearl oysters, there remains a knowledge gap about donor size influence on pearl phenotype.

In the present study, the goal was to improve our understanding of the mechanisms driving the phenotypic variability arising from the recipient and the donor. The working hypothesis was that the recipient oyster confers quantitative traits to the pearl while the individual donor oyster drives qualitative traits of the pearl. In other words, everything related to growth and transfer of energy would be driven by the recipient oyster, and everything related to the quality of the nacrein deposit would be driven by the donor of the graft. Within this framework we defined four specific experiments to determine respective donor and recipient effects. (1) We sought to discern whether the donor or recipient was the main driver of pearl growth rate by comparing different recipient–donor phenotype combinations. (2) We evaluated drivers of the pearl phenotype by comparing effects of different recipient–donor phenotype combinations on nacre deposit quality. (3) We measured biomineralisation potential through a comparison of quantitative gene expression in the mantle graft (donor only effect) and the pearl sac (donor + recipient effect). For this approach, a representative panel of eight genes encoding proteins involved in aragonite biomineralisation (Pif-177, MSI60 and Perline), calcite biomineralisation (Aspein, Shematin and Primalin) or proteins implicated in both layers (Nacrein) was screened^{18–20}. Finally (4), we followed the kinetics of the recipient–donor influence on pearl formation by monitoring pearl size and quality parameters over 12 months. This information provides basic knowledge to help us to understand the donor–recipient correlations and their relative contributions in pearl oyster grafts.

Results

Overall, a total of 289 cultured pearls were harvested and analyzed. Donor pearl oysters were divided into two distinct groups according to their shell size (dorso–ventral measurement): small donor oysters, denoted “QL”, and large ones, denoted “TL”. The distribution of QL and TL oysters are shown in Table 1. Results are presented in four sections relating to 1) the influence of donor and 2) recipient shell size effect on cultured pearl size and cultured pearl quality, 3) biomineralisation capabilities and 4) pearl development kinetics.

QL vs. TL and individual donor influence on pearl phenotype. At grafting time, the donor oyster width, height and thickness were recorded, showing average measurements of 48.6 ± 5.2 mm, 48.6 ± 5.2 mm and 12.7 ± 1.4 mm, respectively, for the QL donor group. The TL donor group was significantly larger for each parameter ($p < 0.0001$) with 79.8 ± 6.3 mm for shell height, 79.9 ± 6.9 mm for shell width and 21.0 ± 2 mm for shell thickness.

Comparing differences in the nacre produced between the QL and TL donor groups, we found that the average nacre weight and thickness of the QL donor group were 0.38 ± 0.22 g and 0.79 ± 0.04 mm, respectively (N = 142). In the TL donor group, the average nacre weight and thickness were 0.34 ± 0.20 g and 0.70 ± 0.04 mm

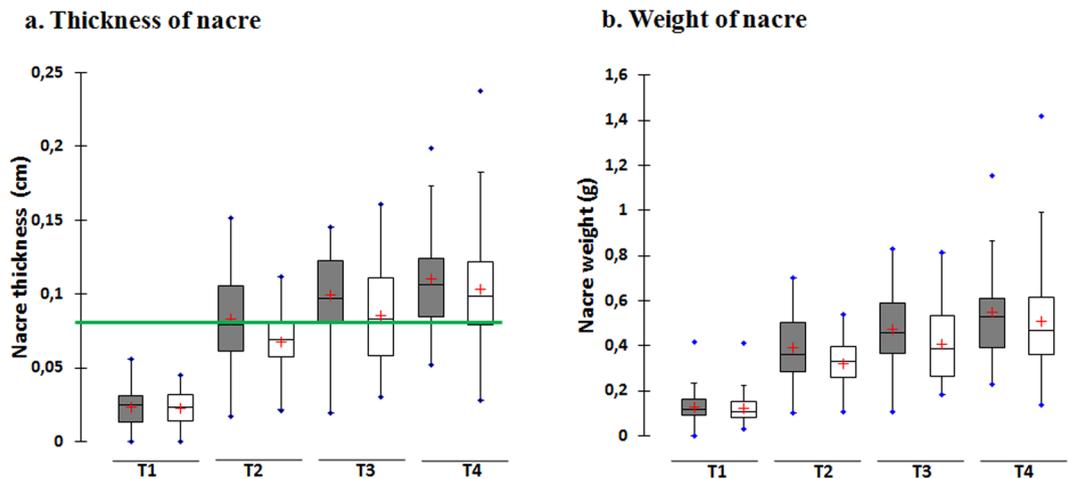


Figure 1. Box-plot showing: (a) thickness of nacre (cm) and (b) weight of nacre (g) on cultured pearls produced using graft tissue from each of the *P. margaritifera* donor phenotypes at each harvest time (T1 corresponds to 3 months of culture, T2 to 6 months, T3 to 9 months and T4 to 12 months). The box-plots in grey represent data for the QL donor phenotype and box-plots in white represent data for the TL donor phenotype. Each box-plot has the following 6 elements: 1) mean (“+” cross in the box-plot); 2) median (solid bar in the box-plot); 3) 25th to 75th percentile (rectangular box); 4) 1.5*interquartile range (non-outlier range of the box whiskers); 5) minimum and maximum values (extreme dots); and 6) outlier values (outside box whiskers). The green line on the nacre thickness box plot corresponds to the minimum nacre thickness necessary for pearl export outside French Polynesia (0.08 cm) (N = 289).

(N = 147). No significant effect of donor oyster shell size phenotype was detected for either nacre weight or thickness ($p = 0.058$ and $p = 0.065$, respectively) (Fig. 1).

When effects of QL/TL donor phenotype were compared for subsequent pearl quality, however, no significant effect of donor oyster size group was observed for any pearl qualitative traits (darkness, luster, surface defects, grade, shape or presence of circle/s) except for color categories (Fig. 2), where the QL phenotype seems to give more pearls of “other” colors and less peacock pearls than the TL donor phenotype.

A significant individual donor effect was detected for nacre thickness ($p = 0.045$), but no significant individual donor effect was shown for nacre weight ($p = 0.059$). Pearls from donor “Q21” (N = 7 pearls) showed the greatest average nacre thickness (1.16 ± 0.50 mm) and nacre weight (0.566 ± 0.298 g) compared with donor “Q17”, which represented the minimum (N = 7 pearls) (0.45 ± 0.32 mm and 0.215 ± 0.141 g, respectively). The influence of donor size and the evolution of this relationship through time on qualitative pearl traits at harvest are illustrated in Figure 2.

A significant individual donor effect was detected for darkness level ($p = 0.002$), color category ($p < 0.0001$), cultured pearl luster (matte or shiny/glossy/highly glossy) ($p = 0.0002$) and the surface defect classes ($p < 0.0001$). However, no significant difference was recorded between the individual donors for the absence/presence of circles ($p = 0.218$) or for the three shape categories ($p = 0.156$).

Recipient influence on pearl phenotype. Nacre thickness and weight were both significantly correlated with recipient oyster shell biometric parameters (weight, height, thickness and width), Spearman rho coefficients ranged from 0.51 to 0.65 and 0.49 to 0.62, respectively. The highest significant positive correlations were found for nacre thickness and pearl weight with recipient pearl oyster weight (Rho = 0.65 and Rho = 0.62, respectively, $p < 0.0001$). In addition, there were significant positive correlations of nacre thickness and weight with shell width (+0.51 and +0.49, respectively, $p < 0.0001$) (Fig. 3).

Molecular phenotype. The relative expression levels of the eight biomineralisation genes analyzed in the donor oyster mantle graft tissue and pearl sacs from the QL and TL groups are shown in Fig. 4a. The comparison between the two groups of donors for the three aragonite-related genes, *Pif-177*, *MSI60* and *Perl1*, showed significant higher gene expression levels in the TL group ($p < 0.0001$) in the graft tissue compared with the QL group. *Shem5*, *Shem 9* and *Calc1* also showed significant higher gene expression levels in the TL group ($p < 0.0001$) compared with the QL group.

All biometric parameters of the donor oysters were significantly correlated with the relative expression level of seven biomineralisation genes in the graft ($p < 0.0001$); only *Prism* was not correlated. Nacre thickness and pearl weight were not correlated with the relative expression level in the graft of eight biomineralisation genes (Fig. 3). Furthermore, the recipients shell height was correlated with the relative expression level of *Perl1* in the pearl sac (Rho = 0.236, $p = 0.0004$ for shell height) (Fig. 3).

Among the eight candidate genes studied in the pearl sac at the three harvest times, the expressions of six were significantly affected by donor phenotype (Fig. 4b). *MSI60* and *Calc1* gene expression levels were significantly higher for “TL” phenotypes compared with “QL” phenotypes ($p = 0.009$ and $p = 0.014$ respectively). *Prism*,

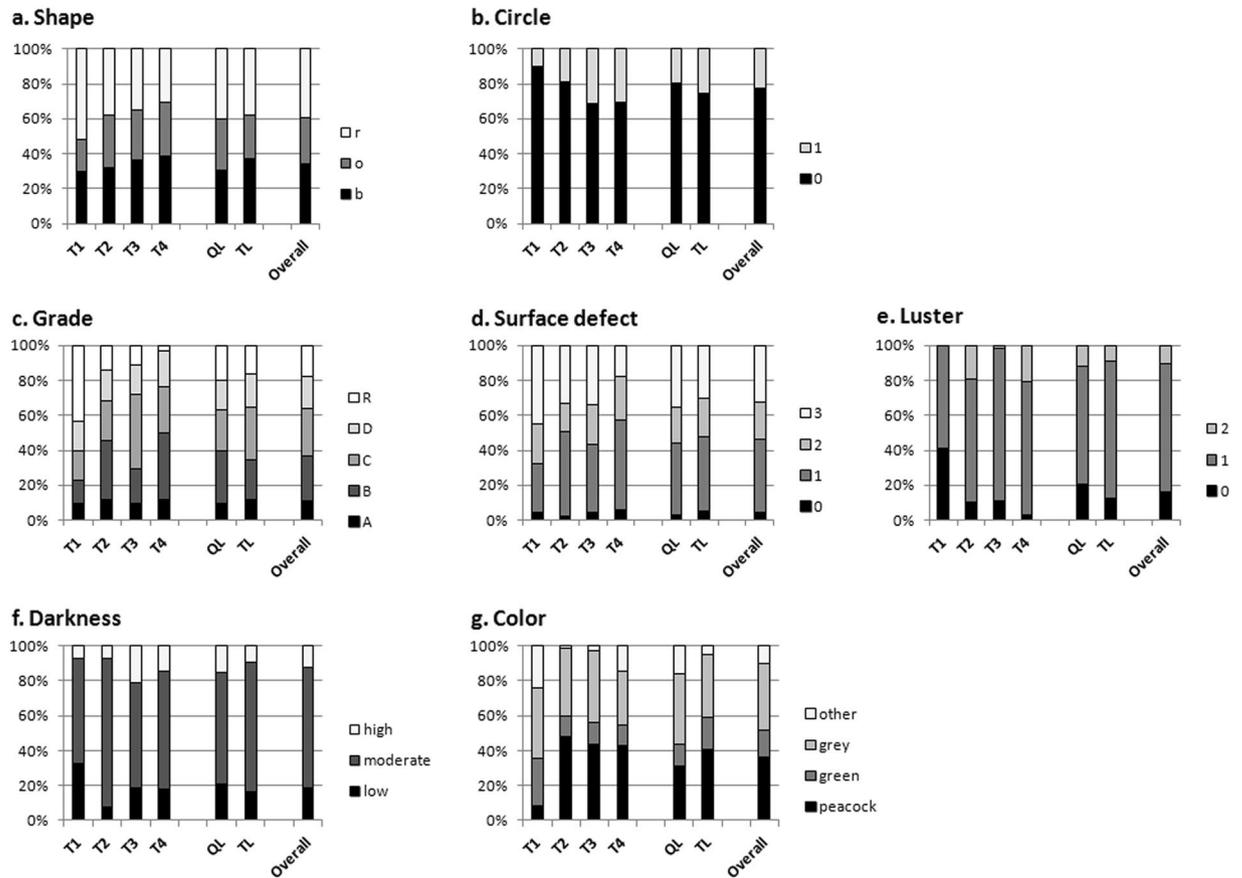


Figure 2. Cultured pearl quality traits from the experimental graft distribution. Percentage of cultured pearls for each harvest time (T1 corresponds to 3 months of culture, T2 to 6 months, T3 to 9 months and T4 to 12 months), for each donor phenotype (groups QL and TL) and for the overall harvest among the following variables are presented: (a) shape categories (“b” for baroque and semi baroque, “o” for oval and drop, “r” for round and semi round pearls), (b) pearl circles (“0” = absence and “1” = presence), (c) classification grade (“A” to “D” and Rejects), (d) surface defect classes (“0” = 0 defects, “1” = 1–5 defects, “2” = 6–10, and “3” = >10 defects), (e) luster levels (“0” = absence of luster, “1” = moderate luster, and “2” = high luster), (f) darkness level (low, moderate and high darkness) and (g) visual color categories (“peacock”, “green”, “grey” and “other”, corresponding to white and yellow pearls).

Asp, *Shem5* and *Shem9* showed significantly greater expression in “QL” phenotypes compared with “TL” ones ($p = 0.043$, $p = 0.049$, $p = 0.004$ and $p = 0.009$, respectively).

No significant differences in relative expression of the panel of genes in the graft were found for pearl quality traits. In the pearl sac, however, significant effects were observed for the majority of the panel of genes, depending on grade, level of surface defects, luster and color (Supplementary Table S1).

Pearl development kinetics. Analyzing kinetics data over the 12 months of the study, we observed, as expected, a very highly significant difference in nacre thickness between harvest times ($p < 0.0001$). Mean nacre thicknesses at harvest times T1, T2, T3 and T4 were 0.02 ± 0.01 , 0.08 ± 0.03 , 0.09 ± 0.03 and 0.11 ± 0.03 cm, respectively. Nacre was significantly thinner at T1 than at T2, T3 and T4. T3 and T4 were not significantly different from one another. Pearl nacre weight was also highly significantly different between harvest times ($p < 0.0001$). Mean pearl weights at harvest times T1, T2, T3 and T4 were 0.12 ± 0.07 , 0.35 ± 0.14 , 0.44 ± 0.17 and 0.54 ± 0.20 g, respectively. T1 pearls were significantly lighter in weight than T2, T3 and T4 ones. As with nacre thickness, T3 and T4 were not significantly different from one another (Fig. 1). Measurements on recipient oysters showed highly significant differences between the four harvest times ($p < 0.0001$), as shown in Fig. 5. Mean height (dorso-ventral measurement \pm SE) for recipient shell at T1, T2, T3 and T4 harvest times were 86.38 ± 5.79 , 91.42 ± 7.38 , 96.15 ± 7.27 and 102.07 ± 7.61 mm, respectively. Mean weight for recipient shell at T1, T2, T3 and T4 harvest times were 84.99 ± 19.34 , 110.38 ± 21.61 , 130.87 ± 24.75 and 144.57 ± 26.14 g, respectively.

Comparison between harvest times showed no significant difference between the proportions of the three shape categories ($p = 0.215$). After 3 months of culture, the pearl shapes were distributed as follows: Baroque 29.6%, $N = 21$; Round 52%, $N = 37$; Oval 18%, $N = 13$. After 12 months of culture, the distribution had remained similar: Baroque 38%, $N = 26$; Round 31%, $N = 21$; Oval 31%, $N = 21$.

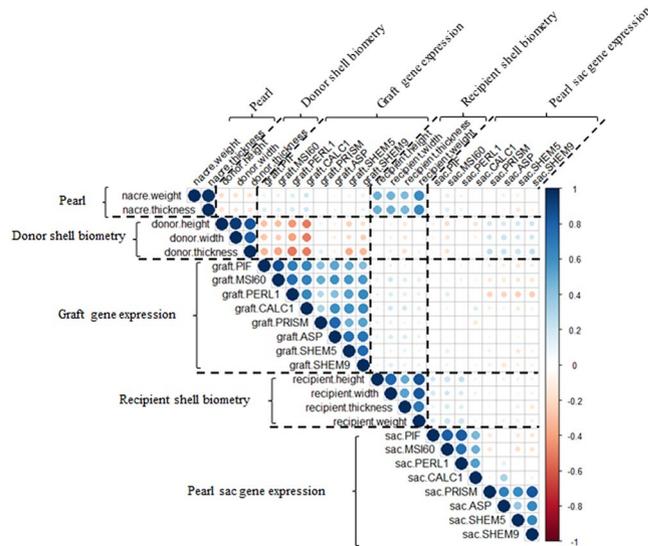


Figure 3. Correlation matrix, made using corplot, between *Pinctada margaritifera* donor and recipient shell biometric parameters (shell height, width, and thickness, and total oyster weight (soft tissue parts + shells)), pearl size (nacre weight and thickness), and the relative expression of the 8 biomineralisation genes in the mantle graft and pearl sac. The areas of circles show the value of corresponding Spearman correlation coefficients. Correlation values are presented in the upper panel in circle; positive correlations are displayed in blue and negative correlations in red. Color intensity (light to dark) and the size of the circle (small to big) are proportional to the correlation coefficients (0 to 1 for the positive coefficient and 0 to -1 for negative coefficient) where for example the correlation coefficients on the principal diagonal is equal to 1 (it was represented in dark blue and biggest size of circle). The legend on the right side of the correlogram shows the Spearman correlation coefficients with their corresponding colors.

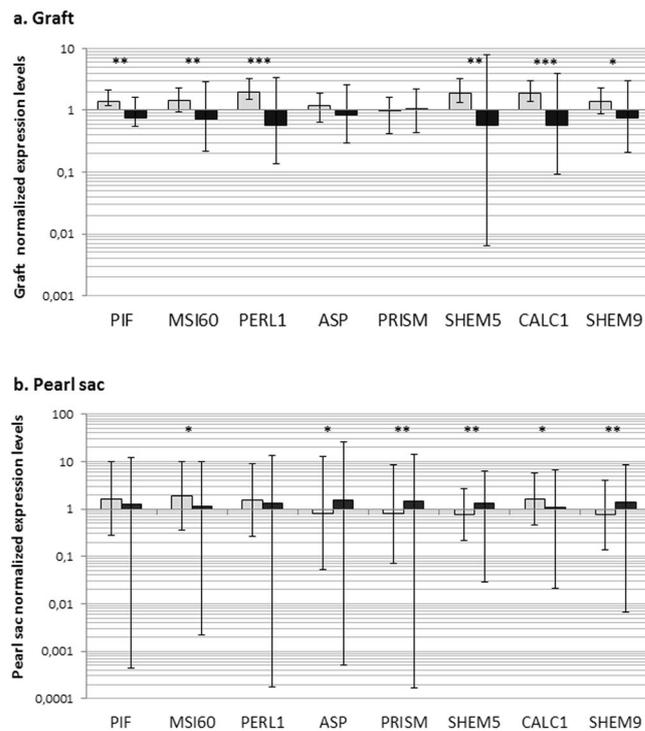


Figure 4. Relative expression of 8 biomineralisation genes in *P. margaritifera* in: (a) the mantle graft (N = 40) and (b) the pearl sac (N = 217 with 108 QL and 109 TL). Histograms in light grey represent data for the TL donor phenotype and histograms in dark grey represent data for the QL donor phenotype. Y axes are in logarithmic scale. Error bars correspond to standard deviations. Statistical differences between the two phenotypes are indicated by asterisks: * for 0.05 < p < 0.005, ** for 0.005 < p < 0.0005, *** for p < 0.0005.

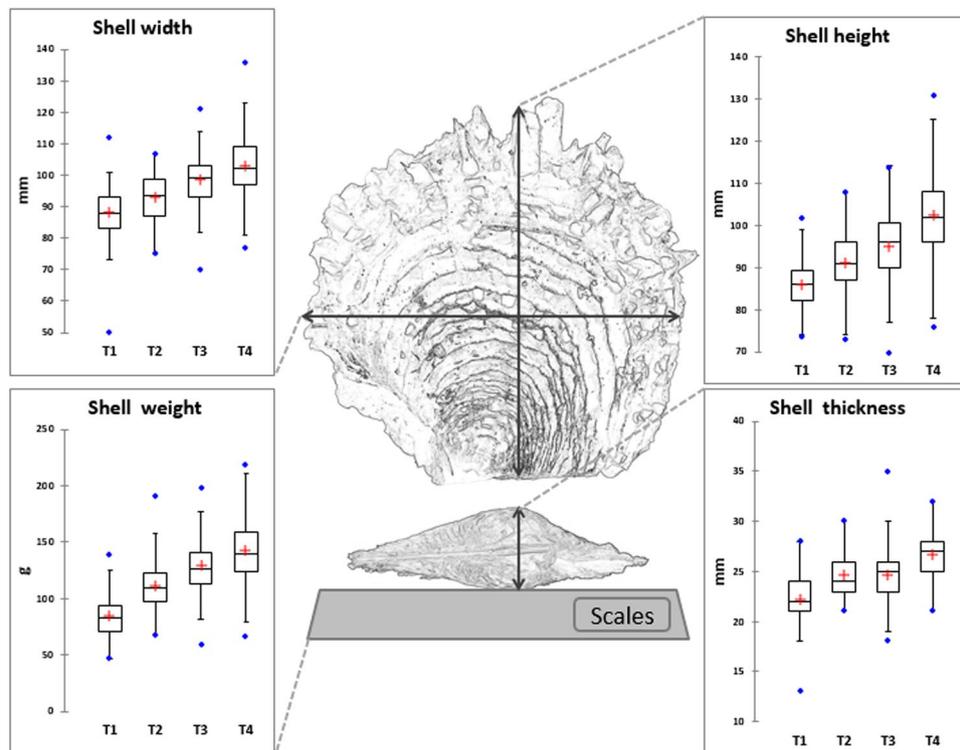


Figure 5. *Pinctada margaritifera* recipient oyster shell biometric parameters measured at each harvest time (T1 corresponds to 3 months of culture, T2 to 6 months, T3 to 9 months and T4 to 12 months of rearing): shell width, height, thickness, and the total oyster weight (soft tissue parts + shells). Each box-plot has the following 6 elements: 1) mean (“+” cross in the box-plot); 2) median (solid bar in the box-plot); 3) 25th to 75th percentile (rectangular box); 4) 1.5th interquartile range (non-outlier range of the box whiskers); 5) minimum and maximum values (extreme dots); and 6) outlier values (outside box whiskers) (N = 289).

Figure 2 shows the ratios of pearls with and without circles at each harvest time. A highly significant effect was recorded for the presence or absence of circles ($p = 0.005$) between each of the harvest times. The T3 and T4 harvest times yielded about three times more circled pearls than T1.

Data analysis showed a highly significant difference in pearl luster and grade between harvest times ($p < 0.0001$). T1 pearls were significantly more “matte” and less “glossy” than T2, T3 and T4 pearls. T1 had significantly less grade B pearls (12.7%) and more Reject pearls (43.7%) than the other harvest times T2 (34.2% and 13.9%, respectively), T3 (19.7% and 11.3%) and T4 (38.2% and 2.9%).

A highly significant difference in the darkness of pearls was observed between the different harvest times ($p = 0.0004$). T1 harvest time had significantly more lighter-toned pearls (32.4%) than the later harvest times T2 (7.6%), T3 (18.3%) and T4 (12.7%). T3 and T4 had significantly more dark pearls (21.1% and 17.7%, respectively) than T1 (7%) and T2 (7.6%) (Figure 2).

For cultured pearl surface defects, no significant harvest time effect was detected ($p = 0.067$) (Figure 2).

Discussion

Our approach, based on studying the influence of donor and recipient phenotypes on resulting pearl and molecular phenotypes, has yielded important results for pearl oyster breeding strategy. Overall, the results show that it is mainly the recipients that influence the size of the pearl, while the individual donors influence pearl quality traits (except for pearl shape and the presence/absence of circles, which seem to be more influenced by graft surgical procedure).

In the present study, we showed that pearl size phenotype (nacre weight and thickness) was highly correlated with the biometric parameters of the recipient oyster, while those of the donor oyster (QL/TL groupings) had no impact. This positive correlation confirms results observed in *P. fucata*¹¹ and in *P. maxima*¹⁵. Furthermore we observe a significant positive correlation between the expression of the aragonite gene in the pearl sac (*Per1*) and one recipient oyster biometric parameter (shell height). This result suggests that the recipient oyster affects the activities of the biomineralising tissues, which are mainly dependent on calcium metabolism in the epithelial tissue of the pearl sac²¹. The recipient oyster regulates the metabolism of the pearl sac by supplying nutrients during the period of culture and thus regulates the expression of the biomineralisation genes, especially those implicated in the aragonite layers²². High biomineralisation capabilities may have contributed to a greater nacre deposition, as already observed in *P. maxima*^{23–25} and *P. fucata*²⁶. The recipient oyster can be compared to the rootstock of a grafted plant, with recipient oyster and rootstock each corresponding to a grafted organism. In the plant system, rootstocks are the driving component of production systems and studies have reported that they can influence

tree growth, yield and fruit size, weight, and rind thickness^{27–33}. However, it is not fully understood how the rootstock controls scion growth. The grafted organism seems to have a key role in growth owing to its nutritive function. Interestingly, the same principle applies in the animal system we studied. The positive relationship between pearl size (nacre weight and thickness) and weight of the recipient is valuable information because it can serve as a basis for selective breeding strategy for fast growing recipient pearl oysters. For mollusk species, between 10% and 20% improvement in selected growth traits can be obtained per generation^{34,35}.

A strong individual donor effect was observed on pearl quality traits, such as color (darkness and visual color categories) and quality parameters (luster, surface defects and grade). Pearl quality traits are influenced by a number of highly variable factors, including genetics, the environment and their interaction, as well as surgical technique and graft hygiene³⁶. A recent study in *P. maxima* found significant individual donor effects for color, nacre deposition, luster, shape and defects; however, each of these traits was grouped into broad categories in this previous study, making specific comparisons between the two studies difficult¹⁵. In plant models, research on rootstock–scion interaction demonstrated that yield and quality are conferred by the scion cultivar. Scion quality clearly affects final yield and fruit quality in grafted plants, but rootstock effects can also impact these characteristics^{4,37}.

Expression analysis in the pearl oyster graft, based on a panel of genes encoding proteins implicated in the shell biomineralisation process, indicated significant differences of gene expression level between the QL and TL donor groups for the three genes of the panel implicated in aragonite formation (*Pif-177*, *MSI60*, and *Perl1*). The protein genes *Pif-177* and *MSI60* regulate growth, nucleation and the organization of the aragonite crystal^{20,22,38}. Perline is the protein equivalent of the N14 protein identified in *P. maxima*³⁹ and seems to be specifically involved in the formation of the nacreous layer and promotion of aragonite crystal nucleation²³. Aragonite-related gene expression levels were significantly higher in the graft tissue from the TL group than from the QL group. Some other genes (*Shematin 5 and 9* and *Nacrein*) showed significantly higher expression levels in the graft originating from the TL group. *Shematin 5 and 9* are implicated in the calcite mineralisation process, in which they facilitate the formation of calcite prisms⁴⁰. These results seem to show the opposite trend to the pearl phenotype observations, since the TL and QL groups did not differ in nacre weight and thickness. The significantly higher expression levels of some genes in the TL group correspond to the biometric parameters of the donor oyster but not to the quantitative traits of the pearl. A study in *P. fucata* examined the differences of gene expression in large and small oysters. RNA-seq analysis revealed that the number of genes up-regulated in small oysters was greater compared to large oysters and could be explained by catch-up growth⁴¹. In the pearl sac analyses, we observed a relationship between relative gene expression in the pearl sac and grade, surface defects, luster and pearl color. The role of the pearl sac in nacreous layer biomineralisation is thought to mirror that of the oyster mantle. The gene-expression patterns of shell matrix proteins in pearl sacs were measured relative to the biomineralisation process of the nacreous layer⁴². The genome of the individual donor oyster and its influence on the pearl biomineralisation process remain active in the pearl sac tissue during the entire pearl culture period right up until harvest time^{9,43–45}, confirming the influence of individual donors on quality pearl traits.

Our examination of pearl formation over time (12 months of rearing) clearly showed that nacreous deposition is not linear. By the half-way point of the experiment (6 months), 69.7% of the final nacre thickness and 65% of the nacre weight had already been reached. At this point, nacre deposition slowed down. No previous study has examined the deposition of the nacreous layer on the pearl over culture time. However, some studies did examine the beginning stage (35 days) of nacreous layer deposition during pearl formation in *P. fucata*^{42,46} and in *P. margaritifera*⁴⁷. These found that the first CaCO₃ deposited on the nucleus was the aragonitic⁴⁷ or calcitic⁴⁶ prismatic layer found in the cross section of the pearl, and that the nacreous layer then formed on top of this prismatic layer. The non-linear nacreous deposit seems to be influenced by the growth of the recipient oyster (whose biometric parameters are correlated with nacre weight and thickness). Shell growth is influenced by two major factors: microalgal concentration and temperature, both of which regulate the expression of most of the shell matrix protein genes implicated in the biomineralisation process²². However, recipient growth had a linear pattern over the 12 months of culture. Thus, the growth of the recipient seems to be an important driving factor of pearl growth but not the only influence implicated. The high influence of the recipient and the weak influence of the donor on pearl size at harvest suggest that their respective roles are not totally revealed here.

In our experiment, we also recorded that luster, grade and darkness of pearls improved with duration of culture, but we also noted an increase in the proportion of circled pearls. According to Wada⁴⁸, who focused on surface color and pigmentation, the quality of nacreous pearls is determined by the ratio of the thickness of the lower prismatic layer to that of the upper nacreous layer. It was therefore logical that we found an improvement of quality grade over time, because nacre deposition increased with time of culture⁴⁹. Individual donor oysters influence quality traits such as color, luster, amount of surface defects and grade but do not affect shape or the presence of circles. The differences observed between quality traits underline the complexity of their genetic basis and that of the donor/recipient interaction.

The present study is the first to identify the relative impact of donor/recipient oyster size on pearl size and quality traits during culture time in the marine bivalve *P. margaritifera*. It was demonstrated that 1) pearl size characters (nacre weight and thickness) are influenced by the recipient oyster phenotype and 2) the major qualitative traits (color, darkness, luster, and incidence of surface defects) are influenced by individual donor oysters. The recipient oyster shell parameters are correlated with pearl size, with the largest recipient giving the largest pearls. Similarly to other examples in the living world, the recipient organism seems to have a more important role than expected. Donor/recipient combinations should therefore be selected carefully. For the pearl industry, the contribution of the recipient found here suggests it would be beneficial to develop breeding programs on growth of recipient oysters in order to obtain larger and thus more valuable pearls. In parallel, a breeding program could be developed for quality and color of donor oysters in order to obtain high quality pearls in desired colors. Furthermore breeding program could be based on pedigree. In fact, genealogy information is essential for genetic

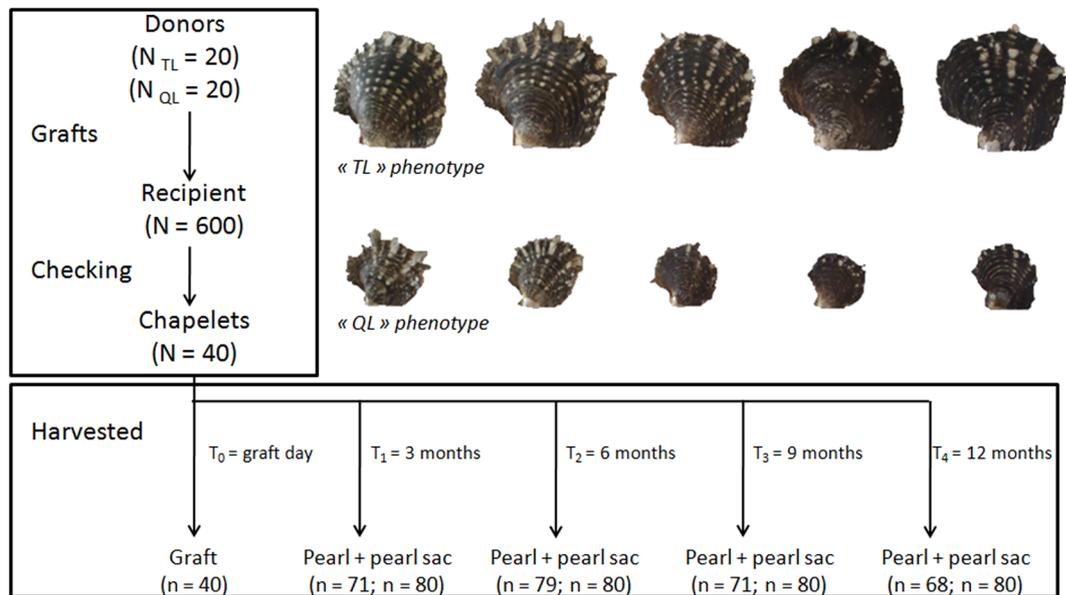


Figure 6. Experimental graft design for *P. margaritifera* donors using QL and TL phenotypes as donors. The grafts ($N = 600$) were performed on Regahiga Pearl farm (Mangareva Island, Gambier archipelago) then nucleus rejection and receiver mortality were evaluated 45 days after the graft operation (checking). Two recipient oysters per donor were randomly harvested every three months of the experiment.

traceability. The importance of maintaining pedigree records could aim to increase effective population sizes and minimise inbreeding to ensure long-term genetic gain, viability of aquaculture breeding programs and productivity by the development for example of a set of multiplex PCRs as in *C. gigas* oyster^{50,51} or in the abalone *Haliotis midae*⁵². The present work could serve as a basis for future studies exploring the donor/recipient relationship in greater depth.

Materials and Methods

Animals. Wild *Pinctada margaritifera* were collected as spat using commercial collectors in the lagoon of Takaroa atoll (Tuamutu archipelago, French Polynesia) in March 2013. Nine months later (December 2013), 20 of these collectors were transferred to Ifremer facilities in Vairao on Tahiti Island (Society Archipelago, French Polynesia). Pearl oysters ($N = 1535$) were then removed from the collectors and divided into two distinct groups according to their shell size (dorso-ventral measurement): small “QL”, ($N = 393$; 2.5 cm in means) and large “TL” ($N = 292$; 4.7 cm in means). The distribution and phenotypes of QL and TL oysters are shown in Table 1 and Fig. 6. These oysters were then tied onto a CTN (Cord Technical Nakasai) rearing system⁵³, where they were left to grow, protected using plastic mesh to prevent predation, until they reached a sufficient size to start the grafting experiment. These oysters were then transferred to Regahiga Pearl Farm (Mangareva island, Gambier archipelago, French Polynesia) to be used as donors. Prior to nucleus implantation and graft surgery, oysters from the QL and TL groups were collected from the rearing station, detached, washed with a high pressure spray (to remove epibiota) and stored until the grafting operation.

Grafting procedure. All grafts were performed under standard production conditions by a single expert at the Regahiga Pearl Farm so as to minimize the grafter effect on pearl quality traits described in ref. 54. The recipient oysters were issued from local natural spat collection in the Mangareva lagoon. A total of 40 donors (20 of the TL phenotype and 20 of the QL phenotype) were used to perform 600 grafts (20 grafts per donor for TL and 10 grafts per donor for QL) over a 2-day period, using 1.8 BU nuclei (5.45 mm diameter; Imai Seikaku Co. Ltd., Japan) (Fig. 6). During the grafting process, 3 to 5 graft tissue pieces of each donor oyster were sampled, preserved in RNAlater[®] and stored at -80°C for subsequent RNA extraction. Recipient oysters were examined 45 days post grafting to estimate nucleus retention and mortality rates, as described in ref. 55.

Measurements of shell biometric parameters and pearl growth rate. Prior to the grafting operation, shell height, width and thickness of the 40 donor oysters were measured using Vernier calipers. All recipient oysters were washed with a high pressure spray to remove epibionts and the following biometric measurements were taken: shell height, width, thickness, and total weight (soft tissue parts + shells) (to 0.01 g) (Fig. 5)¹⁷.

Once harvested, cultured pearls were cleaned by ultrasonication in soapy water with a LEO 801 laboratory cleaner (2-L capacity, 80 W, 46 kHz); they were then rinsed in distilled water. Some *keshi* (small non-nucleated nacre deposits) were also harvested but these were not graded in the present study. The size of the cultured pearls was assessed by measuring nacre thickness and weight⁴⁹.

Cultured pearl quality parameter measurement. Surface defects, luster and grade category of the cultured pearls were evaluated. Cultured pearl shape was characterized in two ways: the presence/absence of

Primer name	Protein name	Function	GenBank Accession Numbers	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
PIF	Pif-177	Aragonite formation	HE610401	AGATTGAGGGCATAGCATGG	TGAGGCCGACTTCTTGG
MSI60	MSI60	Aragonite formation	No accession number but described by B. Marie <i>et al.</i> ¹⁸	TCAAGAGCAATGGTGCTAGG	GCAGAGCCCTTCAATAGACC
PERL1	Perline	Aragonite formation	DQ665305	TACCGGCTGTGTGCTACTG	CACAGGGTGAATATCTGGAACC
ASP	Aspein	Calcite formation	No accession number but described by B. Marie <i>et al.</i> ¹⁸	TGGAGGTGGAGGTATCGTTC	ACACCTGATACCCTGCTTGG
PRISM	Prismalin 14	Calcite formation	HE610393	CCGATACTTCCTATCTACAATCG	CCTCCATAACCGAAAATTGG
SHEM5	Shematin	Calcite formation	HE610376	GTCCGAAACCAATCGTCTG	CTGTGGTGATGGTGACTTCG
CALC1	Nacrein	Aragonite and calcite formation	HQ896199	CTCCATGCACAGACATGACC	GCCAGTAATACGGACCTTGG
SHEM9	Shematin	Calcite formation	No accession number but described by B. Marie <i>et al.</i> ¹⁸	TGGTGGCGTAAGTACAGGTG	GGAAACTAAGGCACGTCCAC

Table 2. Set of forward and reverse primers used for the biomineralisation gene expression analysis in *Pinctada margaritifera*.

circle/s and the shape category (“b” for baroque and semi baroque, “o” for oval and drop, “r” for round and semi round pearls). Two kinds of color evaluation were made on the cultured pearls: the darkness of color and the visually-perceived color category (peacock, green, grey, other). Cultured pearl grade was determined for each sample according to the official Tahitian classification (Journal Officiel 2001 n° 30, 26 July 2001) from the most to least valuable quality: A, B, C, D and Rejects (*rebut*s). Briefly, the five grades are mostly based on surface purity and luster, from A (cultured pearls showing no surface defects or small defects confined to less than 10% of their surface and having very good luster;) to D (cultured pearls showing many highly visible defects over more than two thirds of their surface and having poor luster) and Rejects (cultured pearls that have too many defects to be graded). The latter are consequently discarded and ultimately destroyed. Finally, surface defects and luster (components of cultured pearl grade) were determined separately so that they could be studied independently. Quality traits were evaluated as described in ref. 56. To ensure homogeneity in parameter assessment, all evaluations were made visually (without a jeweler’s loupe) by the same operators.

Biomineralisation gene expression analysis. Oyster shell and cultured pearls are formed by biomineralisation activities in two distinct tissues: the mantle of the recipient and the pearl sac in the gonad, formed from mantle tissue from the donor⁵⁷. Around the nucleus, a pearl sac is formed by proliferation of the outer mantle epithelial cells of the mantle graft which secretes successive nacre layers on the nucleus^{58,59}. Pearl sac consists of mucous cells containing large acidophilic granules and epidermal cells⁴² that secrete proteins resulting into culture pearl formation, a highly controlled biomineralisation process similar to the development of inner shell regulated by the mantle⁶⁰. The description of pearl sac collection is explained in the next section. Similarly to other bivalves, the shell of pearl oyster *P. margaritifera* consists of two polymorphs of calcium carbonate: the inner nacreous layer, which is composed of aragonite, and the outer prismatic layer, which is made of calcite^{61–63}. Shell formation is a highly controlled process involving multiple matrix proteins^{18,38,64}. Recently, the number of genes identified as coding for molluscan shell matrix components has increased^{65–69}. In order to identify the respective contributions of donor vs. recipient, we sampled tissues of the graft during the graft operation (*i.e.*, donor contribution) and tissues of the pearl sac during harvest (*i.e.*, recipient and donor contributions) to compare relative gene expression through screening aragonite-related genes (*Pif-177*, *MSI60*, *Perline*), calcite-related genes (*Aspein*, *Shematin*, *Prismalin*) and one gene implicated in both layers (*Nacrein*) (Table 2). Two genes were used as housekeeping genes chosen based on their ubiquitous and constitutive expression pattern in *P. margaritifera* tissue: SAGE (SAGES: AGCCTAGTGTGGGGTGG/SAGER: ACAGCGATGTACCCATTTCC) (called REF in ref. 22) and GAPDH (GAPDHS: AGGCTTGATGACCACTGTCC/GAPDHR: AGCCATTCCTGCAACTTC)⁷⁰.

After removing the RNAlater by pipetting and absorption, total cellular RNA was extracted from the individual graft tissue (n = 40) or pearl sac samples (n = 240), using TRIzol[®] reagent (Life Technologies) according to the manufacturer’s recommendations. RNA was quantified using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Inc.). Total RNA of each individual was then treated with DNase I using a DNA-free Kit (Ambion). First, strand cDNA was synthesized from 500 ng total RNA using the Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) and a mix of poly (dT) and random hexamer primers. Real-Time PCR amplifications were carried out on a Roche Light Cycler[®] 480. The amplification reaction contained 5 µL LC 480 SYBR Green I Mast (Roche), 4 µL cDNA template, and 1 µL of primer (1 µM), in a final volume of 10 µL. Each run included a positive cDNA and a blank control for each primer pair. The run protocol was as follows: initial denaturation at 95 °C for 10 min followed by 40 cycles of denaturation at 95 °C for 30 s, annealing at 60 °C for 30 s and extension at 72 °C for 60 s. Lastly, the amplicon melting temperature curve was analyzed using a melting curve program: 45–95 °C with a heating rate of 0.1 °C s⁻¹ and continuous fluorescence measurement. All measurements were made in duplicate and all analyses were based on the Ct values of the PCR products.

Relative gene expression levels were calculated using the delta–delta method, normalized with two reference genes, to compare the relative expression results⁷¹ as follows:

$$\text{Relative expression}_{(\text{targetgene, samplex})} = 2^{-\Delta\text{Ct}_{\text{sample, samplex}} - \Delta\text{Ct}_{\text{calibrator, samplex}}} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

Here, the ΔCt calibrator represents the mean of the ΔCt values obtained for the tested gene. The delta threshold cycle (ΔCt) is calculated by the difference in Ct for the target and reference genes. The relative stability of the GAPDH and SAGE combination was confirmed using NormFinder⁷². PCR efficiency (E) was estimated for each primer pair by determining the slopes of standard curves obtained from serial dilution analysis of a cDNA to ensure that E ranged from 90 to 110%. The primers used for amplification are listed in Table 2.

Recipient and donor influence over kinetic evolution. The experiment was monitored over time to evaluate changes in the recipient/donor influence as the graft became established within the recipient. Two recipient oysters were harvested for each donor after 3, 6, 9, and 12 months of culture. Biometric parameters were measured as described in the section ‘Measurements of shell biometric parameters and pearl growth rate’. Pearls and pearl sac tissue were collected at the same time. Measurement of pearl growth rate and associated quality trait phenotypes were measured as described in sections ‘Measurements of shell biometric parameters and pearl growth rate’ and ‘Cultured pearl quality parameter measurement’. At the time of pearl harvest and in order to minimise the contamination of recipient tissues, we first cut the gonads from the host oysters. We then removed the gonad tissue with a surgical blade until only a thin (<0.5 mm) layer of tissue surrounding the pearls remained. At this point, only the pearl sac and the pearl remain. Next, we made an incision in the pearl sac, removed the pearl, and transferred the pearl sac into a 2.0 ml tube with RNAlater[®] until RNA extraction⁴⁴ and placed the pearl in a numbered box. While our technique does not completely remove the potential for gonad tissue contamination within pearl sac samples, it does significantly reduce the possibility for gonad contaminations. In addition, the potential for contamination is further reduced because the gonad itself cannot mineralise and thus poses very little risk, as confirmed by Wang *et al.*⁷³ who found *MSI60* was not expressed within the gonads of *P. fucata*. A total of 80 pearl sacs were sampled every 3 months, giving a total of 240 pearl sac tissue samples over 9 months (tissues from the last point at 12 months were of too poor a quality to be used in the analyses). Biomineralisation potential for 40 grafts and 217 pearl sacs that contained pearls was screened via gene expression as described in section ‘Biomineralisation gene expression analysis’ (Fig. 6).

Statistical analysis. The normality of the data distribution and homogeneity of variance were tested for pearl size, donor, recipient oyster biometric parameters and relative gene expression data using the Shapiro–Wilk test and Bartlett’s test. When necessary, transformations were used to adjust data to this distribution (logarithm or square roots). Group donor size (QL vs. TL) and time harvest were treated as fixed variables for statistical analysis, with donor treated as a random variable unless otherwise stated. A linear mixed effects model was used to assess the effect of the fixed and random variables on nacre weight, thickness and relative gene expression, and a generalized linear mixed effects model (family = binomial) was used for the presence or absence of circles and luster, both using packages lme4 and nlme⁷⁴ with the R[®] software. Qualitative classes based on cultured pearl surface defects, grade and darkness level were re-encoded into ordered categorical response variable. Scores from 0 to 4 were attributed to the different classes from the least to the most valuable. Analyses of ordered categorical response variables (pearl darkness, surface defects and grade) were analyzed using cumulative link mixed models implemented in the ordinal package⁷⁵ with the R[®] software. The significance of fixed variables was tested by comparing the fit of an all-inclusive model with that of a reduced model for each variable using a fisher test or chi-squared test. For the cultured pearl “color categories” and shape categories, donor and time of harvest effect were compared using χ^2 tests.

Spearman’s correlation coefficient was used to evaluate the correlations between nacre weight and thickness, and the four biometric measures of the recipient and donor oysters, and gene expression. We have adjusted the p-value with Bonferroni correction (level of significance = α/c , in which $\alpha = 0.05$, and $c =$ number of comparisons performed) to compare pairwise correlation in multiple comparison. The gene expression values of each graft donor and pearl sac were associated with the corresponding nacre weight and thickness of each pearl. The statistics and the visualization for the correlation matrix (Fig. 3) were done with the R[®] software Hmisc and Corrplot package using the spearman method^{76,77}.

In all cases, the differences were considered statistically significant when p values were lower than 0.05. Statistical analyses were performed using XLSTAT (version 2009.4.02) and R[®] software (version 3.2.1).

References

- Mudge, K., Janick, J., Scofield, S. & Goldschmidt, E. E. A history of grafting. *Horticulture Reviews*, vol. 35 John Wiley & Son, Inc. 437–493 (2009).
- Warschefskey, E. *et al.* Rootstocks: Diversity, Domestication, and Impacts on Shoot Phenotypes. *Trends in plant Science*, doi:10.1016/j.tplants.2015.11.008 (2015).
- Webster, A. D. Rootstocks for temperate fruit crops: current uses, future potential and alternative strategies. *In VII International Symposium on Orchard and Plantation Systems* 557, 25–34 (2001).
- Twoorkoski, T. & Miller, S. Rootstock effect on growth of apple scions with different growth habits. *Sci Hortic* 111(4), 335–343 (2007).
- Hodge, A., Berta, G., Doussan, C., Merchan, F. & Crespi, M. Plant root growth, architecture and function. *Plant Soil* 321, 153–187 (2009).
- Kuijken, R. C. P., van Eeuwijk, F. A., Marcelis, L. F. M. and Bouwmeester, H. J. Root phenotyping: from component trait in the lab to breeding. *Journal of Experimental Botany*, 66, No. 18 pp. 5389–5401 (2015).
- Vazifshenas, M., Khayat, M., Jamalian, S. & Samadzadeh, A. Effects of different scion-rootstock combinations on vigor, tree size, yield and fruit quality of three Iranian cultivars of pomegranate. *Fruits* 64, 1–7 (2009).
- Jerry, D. R. *et al.* Donor oyster derived heritability estimates and the effect of genotype x environment interaction on the production of pearl quality traits in the silver-lip pearl oyster. *Pinctada maxima*. *Aquaculture* 338, 66–71 (2012).
- McGinty, E. L., Evans, B. S., Taylor, J. U. U. & Jerry, D. R. Xenografts and pearl production in two pearl oyster species, *P. maxima* and *P. margaritifera*: effect on pearl quality and a key to understanding genetic contribution. *Aquaculture* 302, 175–181 (2010).

10. Ky, C. L. *et al.* Is pearl colour produced from *Pinctada margaritifera* predictable through shell phenotypes and rearing environments selections? *Aqua Research* (2015a).
11. Wada, K. T. & Komaru, A. Color and weight of pearls produced by grafting the mantle tissue from a selected population for white shell color of the Japanese pearl oyster *Pinctada fucata martensii* (Dunker). *Aquaculture* **142**, 25–32 (1996).
12. Martínez-Ballesta, M. C., Alcaraz-López, C., Muries, B., Mota-Cadenas, C. & Carvajal, M. Physiological aspects of rootstock–scion interactions. *Scientia Horticulturae* **127**(2), 112–118 (2010).
13. Aloni, B., Cohen, R., Karni, L., Aktas, H. & Edelstein, M. Hormonal signaling in rootstock–scion interactions. *Scientia Horticulturae* **127**(2), 119–126 (2010).
14. Falconer, D. S. & Mackay, T. F. C. Introduction to Quantitative Genetics, 4th edn. Harlow, Longman (1996).
15. McDougall, C., Moase, P. & Degnan, B. M. Host and donor influence on pearls produced by the silver-lip pearl oyster. *Pinctada maxima*. *Aquaculture* **450**, 313–320 (2016).
16. Ky, C. L. *et al.* Macro-geographical differences influenced by family-based expression on cultured pearl grade, shape and colour in the black-lip pearl oyster *Pinctada margaritifera*: a preliminary case study in French Polynesia. *Aqua Research*, doi:10.1111/are.12880 (2015b).
17. Le Pabic, L. *et al.* Culture site dependence on pearl size realization in *Pinctada margaritifera* in relation to recipient oyster growth and mantle graft biomineralization gene expression using the same donor phenotype. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. doi:10.1016/j.ecss.2016.03.009 (2016).
18. Marie, B. *et al.* Different secretory repertoires control the biomineralization processes of prism and nacre deposition of the pearl oyster shell. *PNAS* **109**, 20986–20991 (2012).
19. Joubert, C. *et al.* Transcriptome and proteome analysis of *Pinctada margaritifera* calcifying mantle and shell: focus on biomineralization. *BMC Genomics* **11**, 613–626 (2010).
20. Xiang, L. *et al.* Patterns of expression in the matrix proteins responsible for nucleation and growth of aragonite crystals in flat pearls of *pinctada fucata*. *PLoS one* **8**(6), e66564 (2013).
21. Wada, K. T. Relationship between calcium metabolism of pearl sac and pearl quality. *Bull. Natl. Pearl Res. Lab* **16**, 1949–2027 (1972).
22. Joubert, C. *et al.* Temperature and Food Influence Shell Growth and Mantle Gene Expression of Shell Matrix Proteins in the Pearl Oyster *Pinctada margaritifera*. *PLoS ONE* **9**(8), e103944, doi:10.1371/journal.pone.0103944 (2014).
23. Kono, M., Hayashi, N. & Samata, T. Molecular mechanism of the nacreous layer formation in *Pinctada maxima*. *Biochemical and biophysical research communications* **269**(1), 213–218 (2000).
24. Müller, A. Cultured Pearls - The First Hundred Years, Golay Buchel USA Ltd 142 pp. (1997).
25. Strack, E. Pearls. Rülhe-Diebener-Verlag GmbH & Co. Stuttgart, Germany 706 pp. (2006).
26. Gu, Z. *et al.* Expression profiles of nine biomineralization genes and their relationship with pearl nacre thickness in the pearl oyster, *Pinctada fucata martensii* Dunker. *Aquac Res* **47**, 1874–1884 (2014).
27. Autio, W. R. Rootstocks affect ripening and other qualities of “Delicious” apples. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **116**, 378–382 (1991).
28. Autio, W. R., Schupp, J. R., Embree, C. G. & Moran, R. E. Early performance of “Cortland” “Macoun”, McIntoch” and “pioneerMac” apple trees on various rootstocks in Maine, Massachusetts and Nova Scotia. *J. Aler. Pomol. Soc.* **57**, 7–14 (2003).
29. Marini, R. P., Barden, J. A., Cline, J. A., Perry, R. L. & Robinson, T. Effect of apple rootstocks on average “Gala” fruit weight at four locations after adjusting for crop load. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **127**, 749–753 (2002).
30. Son, L. & Kuden, A. Effects of seedling and GF-31 rootstocks on yield and fruit quality of some table apricot cultivars grown in Mersin. *Turk. J. Agric. For.* **27**, 261–267 (2003).
31. Al-Hinai, Y. K. & Roper, T. R. Rootstock Effects on Growth and Quality of Gala’ Apples. *HortScience* **39**(6), 1231–1233 (2004).
32. Kurlus, R. Rootstock effects on growth, yield and fruit quality of two sweet cherry cultivars in western Poland. *Acta Hort.* **795**, 293–298 (2008).
33. Incesu, M., Cimen, B., Yesiloglu, T. & Yilmaz, B. Rootstock effects on yield, fruit quality, rind and juice color of Moro blood orange. *Journal of food, Agriculture & Environment* **11**(3&4), 867–871 (2013).
34. Newkirk, G. F. Review of the genetic and potential for selective breeding of commercially important bivalves. *Aquaculture* **19**, 209–22 (1980).
35. He, M., Guan, Y., Yuan, T. & Zhang, H. Realized heritability and response to selection for shell height in the pearl oyster *Pinctada fucata* (Gould). *Aquaculture research* **39**(8), 801–805 (2008).
36. Southgate, P. C., Lucas, J. S. The pearl oyster. Elsevier, Oxford (2008).
37. Davis, A. R. *et al.* Grafting effects on vegetable quality. *HortScience* **43**(6), 1670–1672 (2008).
38. Suzuki, M. *et al.* An Acidic Matrix Protein, Pif, Is a Key Macromolecule for Nacre Formation. *Science* **325**, 1388–1390 (2009).
39. Bédouet, L. *et al.* Proteomics analysis of the nacre soluble and insoluble proteins from the oyster *Pinctada margaritifera*. *Marine biotechnology* **9**(5), 638–649 (2007).
40. Yano, M., Nagai, K., Morimoto, K. & Miyamoto, H. Shematrin: a family of glycine-rich structural proteins in the shell of the pearl oyster *Pinctada fucata*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **144**(2), 254–262 (2006).
41. Shi, Y. & He, M. Differential gene expression identified by RNA-Seq and qPCR in two sizes of pearl oyster (*Pinctada fucata*). *Gene* **538**(2), 313–322 (2014).
42. Liu, X. *et al.* The role of matrix proteins in the control of nacreous layer deposition during pearl formation. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **279**(1730), 1000–1007 (2012).
43. Arnaud-Haond, S. *et al.* Pearl formation: persistence of the graft during the entire process of biomineralization. *Marine biotechnology* **9**(1), 113–116 (2007).
44. McGinty, E. L., Zenger, K. R., Jones, D. B. & Jerry, D. R. Transcriptome analysis of biomineralisation-related genes within the pearl sac: host and donor oyster contribution. *Marine Genomics* **5**, 27–33 (2012).
45. Masaoka, T. *et al.* Shell matrix protein genes derived from donor expressed in pearl sac of Akoya pearl oysters (*Pinctada fucata*) under pearl culture. *Aquaculture* **384**, 56–65 (2013).
46. Ma, H. *et al.* Aragonite observed in the prismatic layer of seawater cultured pearls. *Front. Mater. Sci. China* **1**, 326–329, doi:10.1007/s11706-007-0061-6 (2007).
47. Cuif, J. P. *et al.* Structural, mineralogical and biochemical diversity in the lower part of the pearl layer of cultivated seawater pearls from Polynesia. *Microsc. Microanal.* **14**, 405–417 (2008).
48. Wada, K.T. Science of the pearl oyster. *Shinju Shinbunsha*, Tokyo, 336 p (1999).
49. Blay, C. *et al.* Influence of nacre deposition on rate on cultured pearl grade and colour in the black-lipped pearl oyster *Pinctada margaritifera* using farmed donor families. *Aquaculture International* **22**(2), 937–953 (2014).
50. Liu, T., Li, Q., Song, J. & Yu, H. Development of genomic microsatellite multiplex PCR using dye-labeled universal primer and its validation in pedigree analysis of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Journal of Ocean University of China* **16**(1), 151–160 (2017).
51. Evans, S. *et al.* The effects of inbreeding on performance traits of adult Pacific oysters. *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* **230**, 89–98 (2004).
52. Rhode, C. *et al.* Comparison of population genetic estimates amongst wild, F1 and F2 cultured abalone (*Haliotis midae*). *Animal genetics* **45**(3), 456–459 (2014).
53. Cabral, P., Mizuno, K. & Tauru, A. Données préliminaires sur la collecte de naissain de nacres (*Pinctada margaritifera*, Bivalve, mollusque) en Polynésie française. *Proc. 5th int. coral reef Cong. Tahiti* **5**, 177–182 (1985).

54. Ky, C. L., Nakasai, S., Molinari, N. & Devaux, D. Influence of grafter skill and season on cultured pearl shape, circles and rejects in *Pinctada margaritifera* aquaculture in Mangareva lagoon. *Aquaculture* **435**, 361–370 (2015c).
55. Ky, C. L., Molinari, N., Moe, E. & Pommier, S. Impact of season and grafter skill on nucleus retention and pearl oyster mortality rate in *Pinctada margaritifera* aquaculture. *Aquaculture International* **22**, 1689–1701 (2014).
56. Ky, C. L. *et al.* Family effect on cultured pearl quality in black-lipped pearl oyster *Pinctada margaritifera* and insights for genetic improvement. *Aquatic Living Resources* **26**, 133–145 (2013).
57. Ellis, S. & Haws, M. Producing pearls using the black-lip pearl oyster (*Pinctada margaritifera*). *Aquafarmer Information Sheet* **141**, 8 (1999).
58. Inoue, N. *et al.* Gene expression patterns and pearl formation in the Japanese pearl oyster (*Pinctada fucata*): a comparison of gene expression patterns between the pearl sac and mantle tissues. *Aquaculture* **308**, S68–S74 (2010).
59. Kishore, P. & Southgate, P. C. A detailed description of pearl-sac development in the black-lip pearl oyster, *Pinctada margaritifera* (Linnaeus 1758). *Aquaculture Research* **47**, 2215–2226 (2014).
60. Zhan, X. *et al.* Expressed sequence tags 454 sequencing and biomineralization gene expression for pearl sac of the pearl oyster, *Pinctada fucata martensii*. *Aquaculture Research* **46**(3), 745–758 (2015).
61. Sudo, S. *et al.* Structures of mollusc shell framework proteins. *Nature (London)* **387**, 563–564 (1997).
62. Marin, F. & Luquet, G. Molluscan shell proteins. *Comptes Rendus Palevol* **3**, 469–492 (2004).
63. Zhang, C. & Zhang, R. Matrix proteins in the outer shells of molluscs. *Mar Biotechnol (NY)* **8**, 572–586 (2006).
64. Miyamoto, H., Miyoshi, F. & Kohno, J. The Carbonic anhydrase domain protein nacrein is expressed in the epithelial cells of the mantle and acts as a negative regulator in calcification in the mollusk *Pinctada fucata*. *Zoological Science* **22**, 311–315 (2005).
65. Montagnani, C. *et al.* Pmarg-Pearlin is a Matrix Protein Involved in Nacre Framework Formation in the Pearl Oyster *Pinctada margaritifera*. *Chem Bio Chem* **12**, 2033–2043 (2011).
66. Huang, X. D. *et al.* Gigabase-Scale Transcriptome Analysis on Four Species of Pearl Oysters. *Mar Biotechnol* **15**, 253–264 (2012).
67. Suzuki, M. & Nagasawa, H. Mollusk shell structures and their formation mechanism. *Can. J. Zool.* **91**, 349–366 (2013).
68. Miyamoto, H. *et al.* The Diversity of Shell Matrix Proteins: Genome-Wide Investigation of the Pearl Oyster, *Pinctada fucata*. *Zoological Science* **30**, 801–816 (2013).
69. Shi, Y. *et al.* Characterization of the pearl oyster (*Pinctada martensii*) mantle transcriptome unravels biomineralization genes. *Mar Biotechnol* **15**(2), 175–187 (2013).
70. Lemer, S., Saulnier, D., Gueguen, Y. & Planes, S. Identification of genes associated with shell color in the black lipped pearl oyster. *Pinctada margaritifera*. *BMC Genomics* **16**, 568 (2015).
71. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods* **25**, 402–8 (2001).
72. Andersen, C. L., Jensen, J. L. & Ørntoft, T. F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Research* **64**, 5245–5250 (2004).
73. Wang, N. *et al.* Quantitative expression analysis of nacreous shell matrix protein genes in the process of pearl biogenesis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **154**(3), 346–350 (2009).
74. Bates, D., Maechler, M., Bolker, B. & Walker, S. lme4: LINEAR MIXED-effects Models Using Eigen and S4. R Package Version 1.1–7. <http://CRAN.R-project.org/package=lme4> (2014).
75. Christensen, R. H. B. Ordinal — Regression Models for Ordinal Data. R Package Version 2013.9–30. <https://cran.r-project.org/web/packages/ordinal/index.html> (2015).
76. Harrell, F. E. Package ‘Hmisc’. <http://cran.r-project.org/web/packages/Hmisc/Hmisc.pdf> (2016).
77. Wei, T. Package ‘corrplot’. <https://cran.r-project.org/web/packages/corrplot/corrplot.pdf> (2016).

Acknowledgements

This study was supported by grants from the “*Direction des ressources marines et Minières*”, through the TripaGEN project (2015–2017). The authors especially would like to thank the host site, SCA Regahiga Pearls (Mangareva island, Gambier archipelago, French Polynesia) for their generous support. The authors are indebted to S. Parrad, S. Nakasai, C. Lo and D. Devaux for their helpful assistance.

Author Contributions

C.B. designed and carried out experiments at the pearl farm and the molecular genetic studies in the laboratory, analyzed the data and wrote the manuscript. C.L.K. helped conceive and design the experiments. S.P. and C.L.K. helped to draft and to revise the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at doi:10.1038/s41598-017-02457-x

Competing Interests: The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2017