

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

MARÍLIA ESPÍNDOLA DE SOUZA

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE REPRODUTORES DE TILÁPIA:
ESTRATÉGIAS PARA A MANUTENÇÃO DA VARIABILIDADE**

Recife, PE

Maio, 2007

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

MARÍLIA ESPÍNDOLA DE SOUZA

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE REPRODUTORES DE TILÁPIA:
ESTRATÉGIAS PARA A MANUTENÇÃO DA VARIABILIDADE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Recursos Pesqueiros e Aqüicultura da Universidade Federal Rural de Pernambuco, para a obtenção do título de Mestre em Recursos Pesqueiros e Aqüicultura.

Orientadora: Dra. MARIA RAQUEL MOURA
COIMBRA, Depto. de Pesca e Aqüicultura,
UFRPE.

Recife, PE

Maio, 2007

Ficha catalográfica

S729c Souza , Marília Espíndola de
Caracterização genética de reprodutores de tilápia: es -
tratégias para a manutenção da variabilidade / Marília
Espíndola de Souza . -- 2007.
77 f. : il.

Orientadora : Maria Raquel Moura Coimbra
Dissertação (Mestrado em Recursos Pesqueiros e Aqüi -
cultura) - Universidade Federal Rural de Pernambuco. De -
partamento de Pesca e Aqüicultura.
Inclui anexo e bibliografia

CDD 639.3

1. *Oreochromis niloticus*
 2. Microsatélite
 3. Endogamia
 4. Isogênico
- I. Coimbra, Maria Raquel Moura
II. Título

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aqüicultura

Parecer da comissão examinadora da defesa de dissertação de mestrado de

MARÍLIA ESPÍNDOLA DE SOUZA

**Caracterização Genética de Reprodutores de Tilápia: Estratégias para a
Manutenção da Variabilidade.**

Área de concentração: **Aqüicultura**

A comissão examinadora, composta pelos professores abaixo, sob a presidência do primeiro, considera a candidata **Marília Espíndola de Souza** como Aprovada.

Recife, 04 de junho de 2007.

Prof^a. Dra. Maria Raquel Moura Coimbra (UFRPE)
Orientador

Prof. Dr. Eudes de Souza Correia (UFRPE)
Membro interno

Prof^a. Dr^a Constância Flávia Junqueira Ayres (UFPE)
Membro externo

Prof. Dr. Edson Ferreira da Silva (UFRPE)
Membro externo

Aos meus pais, Josué e Janete, por
todo amor dedicado, e a meus irmãos
Mirella e Matheus, pelo
companheirismo e amizade.

“Os rios alcançam seu objetivo porque
contornam os seus obstáculos”

Autor desconhecido

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-graduação em Recursos Pesqueiros e Aqüicultura da Universidade Federal Rural de Pernambuco, pela oportunidade.

Ao Laboratório de Genética Aplicada – LAGA (UFRPE), pela oportunidade oferecida e por disponibilizar materiais necessários para a elaboração deste trabalho.

A Profa. Dra. Maria Raquel Moura Coimbra, minha orientadora, por todo o carinho, atenção, apoio, paciência, amizade e por ter tornado este trabalho realidade.

Ao Prof. Manoel Adrião Coordenador do Laboratório de Fisiologia Animal Molecular Aplicada – FAMA, pelo livre acesso as instalações do Laboratório, pela amizade, pelo apoio e por todo o incentivo demonstrado.

A Dr. Reginaldo Carvalho, do Genoma (UFRPE), por disponibilizar o equipamento necessário para a realização deste trabalho.

Aos Professores, Doutores Edson Ferreira da Silva, Constância Ayres, Eudes Corrêa, Maria do Carmo Figueredo por terem aceitado fazer parte Banca Examinadora.

A Mrs. José Patrocínio Lopes, responsável pela Piscicultura da CHESF por todo o apoio dedicado a realização deste trabalho.

Aos amigos Ana Patrícia, Karine, Andréa, Suzianny, Ebenézer, Hozana e Henrique por toda a amizade e companheirismo.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	1
1. OBJETIVOS.....	3
1.1 Objetivo Geral	3
1.2 Objetivos Específicos.....	3
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	4
2.1 Tilapicultura Mundial.....	4
2.2 Tilapicultura no Brasil.....	6
2.3 Variabilidade Genética em Ambientes de Cultivo.....	8
2.4 Marcadores Moleculares.....	10
2.5 Marcadores de Microssatélites.....	11
3. ARTIGO A SER SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA AQUACULTURE “Estrutura genética de duas populações de tilápia cultivadas: potencial para a construção de linhagens homozigotas”.....	13
3.1 Introdução.....	15
3.2 Material e Métodos.....	17
3.4 Resultados.....	20
3.4 Discussão.....	20
3.5 Bibliografia Citada	24
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	38
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39
6. ANEXOS.....	48

LISTA DE TABELAS

Artigo

Tabela 1. Seqüência dos primers e repetições para os três loci de microssatélites analisados.....	29
Tabela 2. Ciclos de temperatura utilizados na PCR.....	30
Tabela 3. Freqüência dos alelos para cada loco de microssatélite.....	31
Tabela 4. Número de alelos, tamanho esperado, tamanho encontrado para cada loci de microssatélite.....	32
Tabela 5. Variabilidade genética das populações de <i>O. niloticus</i> das duas populações para os três loci de microssatélites.....	33
Tabela 6. Índices de Wright (F_{IS} e F_{ST}) para as duas populações de tilápia...	34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Produção mundial de tilápia (1990 a 2004).....	5
Figura 2. Principais produtores de tilápia no mundo em 2004.....	6
Figura 3. Produção nacional de tilápia (1995 a 2004).....	7

Artigo I

Figura 1. Histograma das freqüências dos alelos para o locus UNH 123.....	35
Figura 2. Histograma das freqüências dos alelos para o locus UNH 160.....	36
Figura 3. Histograma das freqüências dos alelos para o locus UNH 190.....	37

RESUMO

As tilápias, originárias do continente africano, são cultivadas em todo o mundo. As populações cultivadas no Brasil são derivadas de importações da *Tilapia rendalli*, realizadas nos últimos 50 anos, posteriormente da *Oreochromis niloticus* e da *O. hornorum*, vinda da Costa do Marfim. Nos últimos 10 anos, a linhagem da *O. niloticus* chamada de “chitralada”, oriunda da Tailândia, disseminou-se amplamente no país. Uma das raras populações de *O. niloticus*, remanescente das primeiras importações, é ainda cultivada na Estação de Piscicultura de Paulo Afonso – EPPA, representando um modelo único de isolamento genético. O presente trabalho objetivou avaliar a variabilidade e diferenciação genética de duas populações de tilápia, *Oreochromis niloticus* e *Oreochromis niloticus* “chitralada”, ambas cultivadas na Estação de Piscicultura de Paulo Afonso – EPPA, a fim de verificar a potencialidade genética para sua utilização em abordagens voltadas a análise de QTLs, bem como para a exploração de vigor híbrido. Foram genotipados 44 indivíduos de cada população para três marcadores de microsatélite e um total de 22 alelos foram encontrados. A heterozigosidade média observada foi de 0,471 para a população de chitralada, e de 0 para a população de nilótica. O coeficiente de diferenciação genética (F_{ST}) obtido foi de 0,627, e o valor médio do coeficiente de endocruzamento (F_{IS}) encontrado foi de 0,309 para a população de chitralada, e de 1 para a população de nilótica. A inexistência de heterozigotos na população de *O. niloticus* sugere que esta população pode ser utilizada na construção de uma linhagem altamente homozigota, como também pode ser explorada para heterose com cruzamentos com a linhagem chitralada.

Palavras-chave: *Oreochromis niloticus*, microsatélite, endogamia, isogênico.

ABSTRACT

Tilapia native to Africa, are cultured worldwide. In the past 50 years, populations of *Tilapia rendalli* have been introduced in Brazil, afterwards *Oreochromis niloticus* and *O. hornorum* populations, originated from Ivory Coast, were also imported. In the last ten years, an *O. niloticus* strain named “Chitralada”, developed in Thailand, completely spread all over the country. One of the populations of *O. niloticus* named Nilotica that remained from the first imports is being cultured at the Aquaculture Station of Paulo Afonso, representing an unique genetic model. The objective of this study was to investigate the genetic variability and differentiation of two tilapia populations of *O. niloticus* and *O. niloticus* “Chitralada” reared in Paulo Afonso Station in order to verify the genetic potentiality of using niloticus population in the construction of a highly inbred strain for further QTL approach or in exploring hybrid vigor. Forty four individuals of each population were genotyped for three microsatellite markers and a total of 22 alleles were found. The mean heterozygosity detected was 0,471 for “Chitralada” population and 0 for the *O. niloticus* population. The coefficient of genetic differentiation (F_{ST}) was 0,627 and the mean inbreeding coefficient (F_{IS}) was 0,309 for Chitralada population and was 1 for *O. niloticus* population. The absence of heterozygosity in the population of *O. niloticus* suggests that this population can be used in the development of a highly homozygous strain as well as in obtaining heterosis in crosses with “Chitralada” population.

Keywords: *Oreochromis niloticus*, microsatellite, inbreeding, isogenic

INTRODUÇÃO

Na aquicultura mundial, os peixes representam o grupo mais importante, participando com 52,5% da produção (OSTRENSKY et al., 2000), destacando-se ciprinídeos, salmonídeos e ciclídeos, em especial as tilápias.

As tilápias são nativas da África, e foram introduzidas em vários países dos hemisférios norte, sul e em especial no Oriente Médio e Ásia, e são hoje cultivadas em mais de 100 países. No Brasil, oitavo maior produtor mundial, variantes e híbridos de tilápia vêm sendo cultivados há cerca de 50 anos (LOVSHIN, 1998).

Várias introduções de tilápias foram realizadas no Brasil para a consolidação da tilapicultura, destacando-se a *Tilápia rendalli*, no ano de 1952 (GODOY, 1959), a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), no ano de 1971, e a *Oreochromis hornorum*, a tilápia Zanzibar, em 1971 (DA SILVA et al., 1975). As introduções mais recentes constituíram-se de linhagens da tilápia Nilótica, a tilápia Chitralada em 1996, e mais recentemente a tilápia Supreme (ZIMMERMANN, 1999, 2003).

Algumas destas espécies e linhagens são hoje cultivadas na Estação de Piscicultura de Paulo Afonso (EPPA), entre elas a *O. niloticus* e a *O. niloticus* - linhagem Chitralada. A população de *O. niloticus* está isolada há mais de 20 anos, sem que houvesse nenhum cruzamento com outras populações de *O. niloticus* ou com diferentes linhagens desta espécie, ou seja, sem que qualquer renovação do plantel fosse efetuada. Já a população de *O. niloticus* Chitralada é produto de um melhoramento efetuado sobre a *O. niloticus* na Tailândia e chegou a EPPA em 2000, tendo sido feita uma primeira renovação do plantel em 2005, a partir de nova importação de indivíduos oriundos da Tailândia, através do Departamento de Obras Contra a Seca (DNOCS). Assim, estas duas populações representam modelos antagônicos em termos de fluxo gênico.

Nos sistemas de aquicultura, os cruzamentos diferem daqueles que ocorrem em

ambiente natural, que são aleatórios. Em cativeiro, o cruzamento entre indivíduos aparentados é maior do que ocorreria por acaso, resultando na diminuição da variabilidade genética (HALLERMAN, 2003).

A variabilidade genética é o atributo mais importante em uma população e constitui o material sobre o qual a seleção natural age. Uma população com variabilidade elevada terá maior possibilidade de enfrentar com sucesso as mudanças do ambiente (SBORDONI et al., 1986).

A variabilidade genética pode ser medida e quantificada em análises moleculares, estas análises são utilizadas para diagnosticar a estrutura de uma determinada população, e como ferramentas para tal estudo são utilizados os marcadores moleculares. Dentre os marcadores mais informativos estão os de microssatélites, tendo em vista sua expressão co-dominante e o multialelismo (CURRAN, 1997).

Diferentes parâmetros genéticos, tais como diversidade alélica, número de alelos, heterozigosidades observada e esperada, coeficiente de consangüinidade (F_{IS}) e coeficiente de diversidade genética (F_{ST}) serão obtidos nas duas populações de tilápia cultivadas na EPPA, a partir da genotipagem de marcadores de microssatélite. Tais parâmetros permitirão comparar os efeitos do manejo dos reprodutores nas duas populações e o potencial para a construção de linhagens homozigotas a partir da população de *O. niloticus*.

1. OBJETIVOS

1.1 Objetivo Geral:

Estimar a variabilidade genética de duas populações de tilápia cultivadas na Estação de Piscicultura de Paulo Afonso (EPPA).

1.2 Objetivos Específicos

- Selecionar marcadores de microssatélite com alto grau de polimorfismo para as duas populações de tilápia.
- Avaliar a variabilidade genética das populações de tilápia da espécie *O. niloticus* e da linhagem melhorada da *O. niloticus* (tilápia Chitralada), cultivadas na Estação de Piscicultura de Paulo Afonso (EPPA).
- Avaliar a diferenciação genética existente entre as populações de tilápia da espécie *O. niloticus* e da linhagem melhorada da *O. niloticus* (tilápia Chitralada), cultivadas na Estação de Piscicultura de Paulo Afonso (EPPA).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Tilapicultura mundial

Tilápia é o nome comum de aproximadamente 70 espécies de peixes taxonomicamente classificadas, da família *Cichlidae*, nativas da África tropical (WATANABE et al., 2002). Essas espécies estão sendo cultivadas em vários países dos hemisférios norte, sul e especialmente no Oriente Médio e Ásia.

Entre as espécies de peixes cultivadas, o grupo das tilápias é o segundo em volume de produção no mundo (NAYLOR et al., 2000), e o terceiro em geração de renda (BORGHETTI et al., 2003), apresentando rusticidade ao manejo (BOSCOLO, 2002), fácil manipulação de sexo, crescimento rápido e carne de ótima qualidade (BOSCOLO, 2003a).

Entre as espécies de maior interesse comercial, destacam-se a tilápia do Nilo (*O. niloticus*), a tilápia de Mossambique (*O. mossambicus*), a tilápia azul (*O. aureus*), a *O. machrochir*, a *O. hornorum*, a *O. galilaeus*, a *Tilapia zilli* e a *Tilapia rendalli* (EL-SAYED, 1999).

O cultivo de tilápias teve início no Quênia em 1924 e posteriormente no Congo em 1937 e as primeiras informações sobre a tilápia como espécie promissora para a aqüicultura ocidental surgiram na década de 50 (<http://www.mercadodapesca.com.br>).

Em um período de pouco mais de 50 anos, a produção mundial de tilápia chegou a 1.822.738 toneladas, representando assim um crescimento de 480,7% (Figura 1) de acordo com a FAO (2004).

Entre os maiores produtores de tilápia destacam-se China, Egito, Filipinas e México que, juntos, produzem 68% de toda a produção mundial, sendo que o Brasil ocupa o 8º lugar (Figura 2), com 4% da produção (AMERICAN TILAPIA ASSOCIATION, 2004).

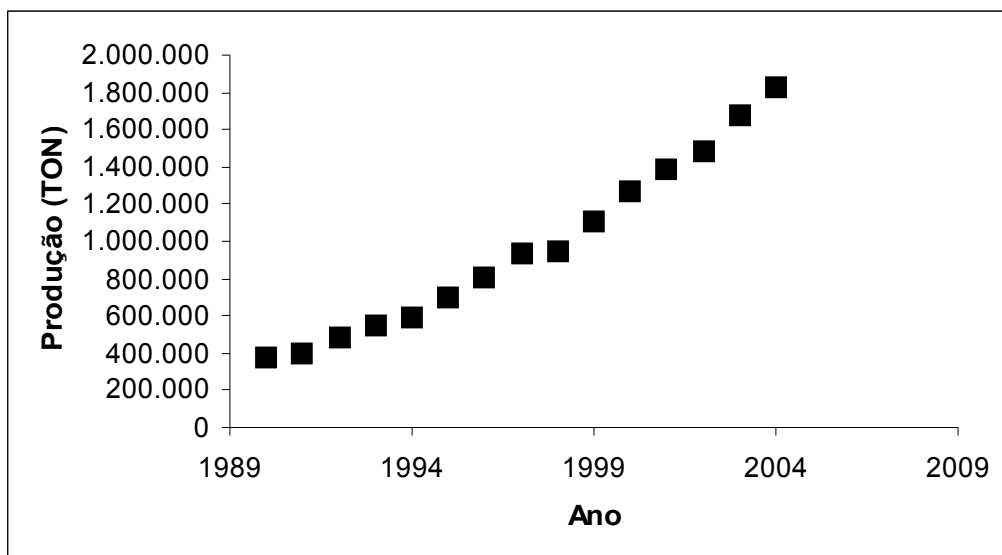


Figura 1: Produção mundial de tilápia (1990 a 2004) (fonte: FAO, 2004)

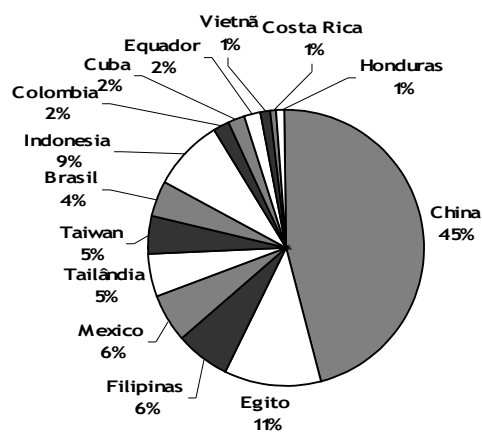


Figura 2: Principais produtores de tilápia no mundo em 2004 (Fonte: American Tilapia Association, 2004).

2.2 Tilapicultura no Brasil

No Brasil, a tilápia vem sendo cultivada há mais de quatro décadas, no entanto, a criação intensiva teve início somente a partir de 1990 (SILVA e CHAMMAS, 1997). A produção vem crescendo de forma consistente no país, saindo de um patamar de pouco

mais de 12 mil toneladas em 1995 para quase 70 mil toneladas (Figura 3) em 2004, mostrando um crescimento de mais de 500% (FAO, 2004).

Entre os estados que detêm a maior produção de tilápia em aquicultura continental está o Ceará com produção em 2004 de 18.000 toneladas, seguido do Paraná, São Paulo e Bahia, com 11.921, 9.758 e 7.137 toneladas, respectivamente (ESTATÍSTICA DA PESCA, 2004).

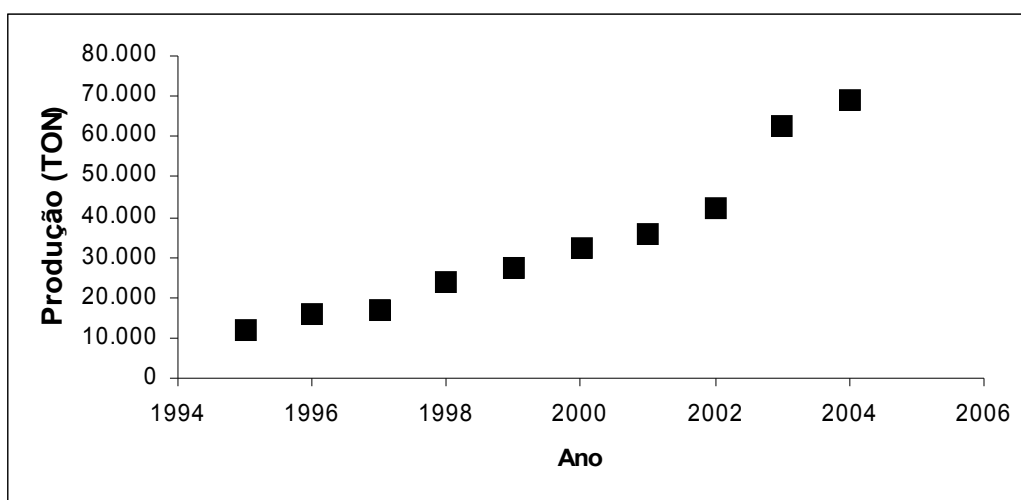


Figura 3: Produção nacional de tilápia (1995 a 2004) (fonte: FAO, 2004).

A primeira espécie do grupo tilápia que chegou ao Brasil foi a *Tilapia rendalli*, no ano de 1952, em São Paulo (GODOY, 1959). A segunda introdução de peixes deste grupo foi constituída pelas espécies *O. niloticus*, tilápia do Nilo, e *O. hornorum*, tilápia Zanzibar, por intermédio do DNOCS em Pentecostes no Ceará em 1971 (DA SILVA et al., 1975).

As outras introduções foram de híbridos, como a tilápia vermelha, oriunda de Honduras e a tilápia híbrida “red koina”, trazida da Universidade do Arizona pela companhia americana Sun West para o interior do estado de Pernambuco em 1995.

Em 1996, uma linhagem melhorada de crescimento rápido da espécie *O. niloticus*, a tilápia Chitralada, foi introduzida no Brasil. Esta linhagem foi desenvolvida no Japão e melhorada no Palácio de Chitral na Tailândia, a partir de alevinos doados pelo Asian Institute of Technology (AIT) (ZIMMERMAN, 1999).

Registros de programas de melhoramento com espécies de tilápia são escassos na literatura e o mais importante deles envolvendo a espécie *O. niloticus* foi desenvolvido pelo Genetic Improved Farmed Tilapia (GIFT), que envolveu quatro populações selvagens de tilápias capturadas entre 1988 e 1989 no Egito, Gana, Quênia e Senegal, e quatro populações cultivadas nas Filipinas, Israel, Singapura, Tailândia e Taiwan (BENTSEN et al., 1998).

Recentemente, uma nova linhagem de tilápia foi introduzida no mercado brasileiro, a GST (Genomar Supreme Tilapia), desenvolvida pela empresa Genomar, após mais de 20 anos de seleção genética. Esta linhagem foi desenvolvida a partir da hibridização de oito diferentes linhagens, provenientes da Ásia e da África (<http://www.aptaregional.sp.gov.br>).

2.3 Variabilidade Genética em Ambientes de Cultivo

Nos sistemas de aquicultura os cruzamentos diferem daqueles que ocorrem em ambiente natural, que são aleatórios. Em sistemas fechados o cruzamento é feito com um número reduzido de indivíduos, que podem ser aparentados. Neste caso ocorre um aumento do cruzamento entre indivíduos aparentados mais do que ocorreria por acaso, uma condição conhecida como endogamia. A endogamia tem como consequência o aumento da homozigidade, e, portanto, uma redução na heterozigidade (HALLERMAN, 2003). Esta situação normalmente permite que alelos deletérios recessivos entrem em homozigose e manifestem fenótipos indesejáveis, que podem variar de deformidades grosseiras, ou de forma indireta, por uma redução da sobrevivência das larvas, da viabilidade de juvenis e a susceptibilidade a doenças (APPLEYARD e MATHER, 2000; LUTZ, 2001).

Dunham et al. (1987) descreveu uma série de impactos oriundos da endogamia no *catfish* (*Ictalurus punctatus*), que mesmo em uma única geração mostraram baixo desenvolvimento dos ovos e um decréscimo na taxa de eclosão de aproximadamente

15%.

O estoque de reprodutores dentro de um sistema de aquicultura é sempre inferior àquele de populações selvagens. Em cultivos formados por um número pequeno de reprodutores, uma boa parte da variação genética natural será perdida. Cada variante alélica de um dado *locus* em uma população pode ser tomada como parte de um “recurso genético” na população (BEAUMONT e HOARE, 2002). Um único alelo ou uma combinação de alelos poderá ser responsável por conferir ao portador uma característica valiosa, como por exemplo, a resistência a uma determinada doença, uma maior tolerância ao frio ou um melhor crescimento, de tal modo que a perda de variantes alélicas compromete a sustentabilidade da população (MEFFE, 1986).

Muito embora a endogamia interfira no desempenho produtivo de uma população, ela também tem seu valor comercial, podendo ser utilizada na construção de linhagens altamente homozigotas. Tais linhagens são homozigotas para a maior parte de seus *loci*, contudo linhagens diferentes poderão ser homozigotas para diferentes alelos. Quando duas linhagens diferentes são cruzadas para produzir a geração “F₁ híbrida”, que será heterozigota para muitos *loci*, esta costuma demonstrar um desempenho superior à dos parentais (BEAUMONT e HOARE, 2002).

Uma população pode ser avaliada geneticamente por meio de vários parâmetros, como, heterozigosidade observada e esperada, o número de alelos efetivos, a frequência alélica, os coeficientes de endogamia (F_{IS}) e coeficiente de diferenciação genética (F_{ST}) (FALCONER, 1987).

2.4 Marcadores Moleculares

O estudo populacional, por muitos anos era baseado nos fenótipos dos organismos. Sendo estas variações raras, as populações por várias vezes foram classificadas como homogêneas (FUTUYAMA, 1992).

O emprego de marcadores moleculares teve início na década de 80, e são assim denominados por utilizarem o polimorfismo da molécula de DNA, havendo para isso, grande variedade de técnicas desenvolvidas (LINCH e WALSH, 1998).

Marcadores moleculares são características do DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos e são herdadas geneticamente, podendo estar presentes em regiões codificantes ou não do DNA (SANO et al., 1997).

Diversas técnicas moleculares têm sido amplamente aplicadas em estudos de genética pesqueira em diferentes países (THORPE et al., 2000; WARD et al., 2000). A vantagem da utilização de marcadores moleculares é que os dados obtidos são mais precisos e são menos influenciados pelo ambiente. Na genética pesqueira são utilizados sistemas polimórficos para a comparação das freqüências gênicas de diferentes populações ao longo da área a ser explorada (OVENDEN, 1990).

Os principais tipos de marcadores moleculares podem ser classificados em dois grupos: dominantes e co-dominantes. Entre o grupo dominante estão os marcadores de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (WILLIAMS et al., 1990), e os marcadores de AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) (VOS et al., 1995). Já para o grupo de co-dominantes, incluem os marcadores do tipo: RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) (BOTSTEIN et al., 1980), minissatélites ou *locus* VNRT (Variable Number of Tandem Repeats) (JEFFREYS et al., 1985), SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions), STS (Sequence Tagged Sites) (PARAN e MICHELMORE, 1993), e Microsatélite (LITT e LUTTY, 1989).

O estudo genético da biologia de populações deve estar concentrado no uso de marcadores co-dominantes, pois estes fornecem dados mais robustos para as análises quando comparados a marcadores dominantes, que possuem desvantagens técnicas e analíticas (SUNNUCKS, 2000).

2.5 Marcadores de Microssatélites

Microssatélites são pequenas seqüências repetidas (de 1 a 6 nucleotídeos), abundantes, distribuídas ao acaso por todo o genoma. Eles apresentam grande polimorfismo, são de fácil identificação e têm sido utilizados em mapas de ligação em mamíferos, identificação individual em controle de paternidade e caracterização genética de populações (MENEZES et al., 2006).

O termo microssatélite foi utilizado primeiramente para as repetições CA ou GT (LITT e LUTY, 1989). Termos como “simple sequences” e “short tandem repeats” (EDWARDS et al., 1991; TAUTZ, 1989) foram usados para designar outros tipos de repetições.

Os microssatélites são flanqueados por seqüências únicas e possuem características co-dominantes, na qual os heterozigotos podem ser identificados. Além disto, são altamente polimórficos, devido ao número de repetição das bases (HANCOCK, 1999), que pode ser variável entre os indivíduos de uma mesma espécie.

Os microssatélites estão distribuídos aleatoriamente pela região eucromática do genoma de diversos organismos, o que permite uma cobertura completa dos cromossomos de uma dada espécie, sendo encontrados em seres humanos (LITT e LUTY, 1989), *Drosophila* (TAUTZ, 1989), camundongos (LOVE et al., 1990), entre outros.

Os microssatélites podem ser amplificados via Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando primers específicos complementares às seqüências únicas que os flanqueiam. Eles são seletivamente neutros (seqüências não codificadoras) e possuem características mendelianas (STRASSMANN et al., 1996).

Em função da codominância e do multialelismo, os marcadores moleculares de microssatélite possuem um elevado conteúdo de informação de polimorfismo (PIC-Polymorphism Information Content). O Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC), descrito por Botstein et al. (1980), é um indicador da qualidade do marcador em estudos

genéticos (segregação, identificação de populações e controle de paternidade). Segundo a classificação deste autor, marcadores com valores de PIC superiores a 0,5 são considerados muito informativos, com valores entre 0,25 e 0,50 mediamente informativos, e com valores inferiores a 0,25, pouco informativos.

3. ARTIGO CIENTÍFICO

Estrutura genética de duas populações de tilápia cultivadas: potencial para a construção de linhagens homozigotas

Artigo a ser submetido para o periódico Aquaculture

SOUZA, M.E. ¹; OLIVEIRA, K.K.C.¹; SANTOS, A.C.L.¹; COIMBRA, M.R.M.^{1*}

¹Departamento de Pesca e Aqüicultura, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil; Laboratório de Genética Aplicada – LAGA, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil.

*Autor para correspondência: Maria Raquel Moura Coimbra, Laboratório de Genética Aplicada – LAGA, Departamento de Pesca e Aqüicultura, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n – Dois Irmãos Recife –PE, Brasil, Cep 52171-900, Tel: 81-33206522,
e-mail: raquel@depaq.ufrpe.br

Resumo

O cultivo de tilápia no Brasil teve início em 1971 com a introdução da tilápia Nilótica (*Oreochromis niloticus*). Várias introduções de espécies e linhagens de tilápia Nilótica ocorreram nos anos subseqüentes, em especial a tilápia Chitralada. A estação de piscicultura de Paulo Afonso (EPPA), pertencente à Companhia Hidroelétrica do São Francisco (CHESF), possui duas populações de tilápia, uma de tilápia Nilótica e uma de tilápia Nilótica Chitralada. A primeira população foi mantida isolada ao longo dos últimos 23 anos sem que fossem introduzidos indivíduos de outras populações. A segunda população, *O. niloticus* Chitralada, teve seu plantel de reprodutores renovado em 2005 com nova importação de alevinos. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a variabilidade e a diferenciação genética existente entre as duas populações de tilápia cultivadas na Estação de Piscicultura de Paulo Afonso, a fim de verificar a potencialidade para a construção de uma linhagem altamente homozigota e para a exploração de heterose. Foram genotipados 44 indivíduos de cada população para três marcadores de microssatélite e um total de 22 alelos foram encontrados. A heterozigosidade média observada foi de 0,471 para a população de Chitralada, e de 0 para a população de Nilótica. O coeficiente de diferenciação genética (F_{ST}) obtido foi de 0,627, e o valor médio do coeficiente de endocruzamento (F_{IS}) encontrado foi de 0,309 para a população de Chitralada, e de 1 para a população de Nilótica. Os valores do PIC encontrados variaram de 0,461 a 0,871 para a população de Chitralada. A inexistência de heterozigotos na população de *O. niloticus* sugere que esta população pode ser utilizada na construção de uma linhagem altamente homozigota, como também pode ser explorada para heterose com cruzamentos com a linhagem Chitralada.

Palavras-chave: *Oreochromis niloticus*, microssatélite, endogamia

1. Introdução

Tilápia é o nome genérico de um grupo de ciclídeos endêmicos da África, que consiste de três gêneros importantes para a aquicultura – *Oreochromis*, *Sarotherodon* e *Tilapia*. O gênero mais cultivado é o gênero *Oreochromis* que em 2004 teve produção mundial estimada de 250.880,1 toneladas. A tilápia do Nilo é, entre as espécies do gênero *Oreochromis*, a que possui maior representatividade na produção mundial (FAO, 2004).

A tilápia Nilótica vem sendo melhorada há vários anos, e as linhagens resultantes desses programas recebem nomenclaturas distintas, como Chitralada, GIFT e GST, entre outros, que possuem crescimento mais rápido e nível de conversão alimentar mais alto. Atualmente o cultivo de *O. niloticus*, que não seja produto de melhoramento está restrito a alguns países, como Brasil, Egito, Taiwan, Filipinas, Argentina, China, e México (Ridha, 2006).

O cultivo de tilápia no Brasil teve início em 1971 com a introdução da tilápia Nilótica (*Oreochromis niloticus*). Várias introduções de espécies e linhagens de tilápia Nilótica ocorreram nos anos subseqüentes, em especial a tilápia Chitralada. Esta espécie foi desenvolvida no Japão e melhorada no Palácio de Chitral na Tailândia, tendo sido introduzida no Brasil em 1996, a partir de alevinos doados pelo Asian Institute of Technology (AIT), e que vem sendo melhorada em nosso país (Zimmermann, 1999).

A estação de piscicultura de Paulo Afonso (EPPA), pertencente à Companhia Hidroelétrica do São Francisco (CHESF), possui duas populações de tilápia, uma de tilápia Nilótica, adquirida em 1984 e outra de tilápia Nilótica Chitralada, adquirida em 2000. A primeira população foi mantida isolada ao longo dos últimos 23 anos sem que fossem introduzidos indivíduos de outras populações. A segunda população, *O. niloticus* Chitralada, teve seu plantel de reprodutores renovado em 2005 com nova importação de alevinos. Atualmente, o plantel de Chitralada é constituído de 420 machos e 800 fêmeas e

o plantel de Nilótica é constituído de 200 machos e 200 fêmeas (José Lopes Patrocínio, comunicação pessoal, 2006).

Nos sistemas de aquicultura os cruzamentos são geralmente realizados com um número reduzido de indivíduos. Se estes indivíduos forem aparentados, pode ocorrer um aumento da consangüinidade na prole resultando na endogamia. A endogamia tem como consequência uma redução na heterozigosidade (Hallerman, 2003), permitindo que alelos deletérios recessivos entrem em homozigose e manifestem fenótipos indesejáveis, que podem variar de deformidades grosseiras a uma diminuição da sobrevivência das larvas, da viabilidade de juvenis e a susceptibilidade a doenças (Appleyard e Mather, 2000; Lutz, 2001).

A população de *O. niloticus*, cultivada em Paulo Afonso, representa um importante modelo genético da espécie *O. niloticus*. Os atributos que a tornam importante referem-se ao fato de que tal população jamais foi submetida a qualquer tipo de seleção dirigida e não teve seu plantel renovado pela introdução de reprodutores pertencentes a linhagens de *O. niloticus* nos últimos 23 anos. Estes fatos sugerem a possibilidade de que esta população possa apresentar altos níveis de homozigose, quando comparada a tilápia Chitralada.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a estrutura e diferenciação genética de duas populações de *O. niloticus*, com origens distintas, ambas cultivadas na Estação de Piscicultura de Paulo Afonso (EPPA), utilizando marcadores moleculares de microssatélites.

2. Material e Métodos

2.1 Coleta das amostras

Foram coletados 100 µl de sangue do pedúnculo caudal de 88 indivíduos das duas populações de tilápia, sendo 44 indivíduos da população de *O. niloticus* e 44 indivíduos da população de *O. niloticus* Chitralada. O sangue foi acondicionado em microtubos de 2 ml, contendo cerca de 1800 µl de etanol a 95%, e conservado em freezer a -80°C até o momento da extração do DNA.

2.2 Extração de DNA genômico

A extração do DNA genômico seguiu o protocolo de Coimbra et al. (2003), com modificações. Uma alíquota de 50 µl de sangue foi transferida para um novo microtubo, onde foram adicionados 300 µl de tampão de extração (NaCl 100 mM; Tris-HCl pH 8,0 20 mM; EDTA 100 mM) para hidratação da amostra. Após homogeneização, centrifugou-se por cinco minutos, a 4° C e 3.000 rpm, e descartou-se o sobrenadante. Repetiu-se o processo anterior por mais uma vez e acrescentou-se 500 µl de tampão de extração com uma concentração final de 0,5% de SDS e 100 µg/ml de Proteinase K. A mistura foi incubada a 50° C por duas horas, e em seguida, a 37° C por 12 horas.

A purificação foi feita com fenol, seguido de FCI (Fenol, Clorofórmio, Álcool Isoamílico), e finalmente com clorofórmio. O DNA foi precipitado com etanol absoluto; lavado com etanol a 70%, e ressuspendido em TE (10 mM Tris- HCl pH 8,5; 1 mM EDTA).

2.3 Quantificação do DNA

A quantificação foi realizada em espectrofotômetro e em géis de agarose a 0,8%,

submetidos à eletroforese. Alíquotas de DNA foram submetidas à eletroforese e comparadas com o DNA do fago λ (100 e 200 ng). Os géis corados com brometo de etídio foram visualizados em luz ultravioleta. Após a quantificação, a concentração do DNA foi ajustada para 50 ng/ μ l.

2.4 Condições de amplificação

As reações de amplificação foram feitas em um volume final de 10 μ l contendo 1X tampão de PCR (50 mM KCl; 20 mM Tris pH 8,4), 2,5 mM MgCl₂, 200 μ M de cada dNTP, aproximadamente 50 ng de DNA, 1U de *Taq* polimerase e 5 pmoles de cada primer (Tabela 1). Os ciclos de amplificação estão descritos na Tabela 2.

2.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida

Os amplicons foram separados em gel de poliacrilamida a 6%. Foram utilizados 4 μ L de cada produto de PCR e 2 μ L do tampão de carregamento da amostra (NaOH, azul de bromophenol, xileno cianol em uma proporção de 2:1). Um marcador de peso molecular de 10pb (Invitrogen) foi utilizado nas eletroforeses a fim de se estimar o tamanho dos amplicons. A eletroforese foi conduzida em uma cuba vertical, a 2000 V, 60MA e 55W, com uma duração média de 1 hora e 30 min.

Após a eletroforese, o gel de poliacrilamida foi fixado com ácido acético a 10%, corado com nitrato de prata a 0,1% e revelado com carbonato de sódio (0,2 mM) Posteriormente os géis foram digitalizados em um scanner.

2.6 Análises estatísticas

O programa GENEPOP v 3.4 (Raymond e Rousset, 1995) foi utilizado para as análises estatísticas, na obtenção de dados como frequência alélica (n_a),

heterozigosidades observada (H_o) e esperada (H_e), os coeficientes F de Wright (1922), coeficiente de endogamia (F_{IS}) e coeficiente de diferenciação genética (F_{ST}) e o desequilíbrio de ligação.

O número de alelos efetivos (a_e) foi calculado através da seguinte fórmula: $a_e = 1/\sum x_i^2$, onde o x_i é a frequência de cada alelo por *locus*.

O conteúdo de informação polimórfica (PIC), descrito por Botstein et al., (1980), é um indicador da qualidade do marcador em estudos genéticos, sendo calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$PIC = 1 - \left(\sum_{i=1}^k x_i^2 \right) - \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k 2x_i^2 x_j^2$$

Onde:

K = número de alelos

X_i = frequência relativa do alelo i na amostra

X_j = frequência relativa do alelo j na amostra

3. Resultados

Para a realização da genotipagem, foram selecionados três *loci* de microssatélite de um total de oito *loci* testados. Para os três *loci* de microssatélite estudados, foram encontrados 22 alelos diferentes. O *locus* UNH123 apresentou três alelos, o *locus* UNH106 apresentou sete alelos e o *locus* UNH190 apresentou doze alelos para as duas populações (Tabela 3). O tamanho dos alelos variou de 180 pb a 220 pb para o *locus* UNH123, de 120 pb a 160 pb para o *locus* UNH106 e de 150 pb a 190 pb para o *locus* UNH190 (Tabela 4). O tamanho dos alelos e a distribuição da frequência para os três *loci* de microssatélites estão representados nas Figuras 1, 2 e 3.

As heterozigosidades média observada e a esperada para a população de Chitralada foram de 0,471 e de 0,674, respectivamente. A heterozigosidade para a população de nilótica foi de 0,000 tanto para a heterozigosidade observada, quanto para a esperada (Tabela 5).

O coeficiente de diferenciação genética (F_{ST}) encontrado foi 0,627, e o coeficiente de endogamia (F_{IS}) encontrado foi de 0,309 (Tabela 6).

Os valores do PIC (conteúdo de informação polimórfica) encontrados para os três *loci* variaram de 0,461 a 0,871 para a população de Chitralada. Para a população de nilótica os valores relativos ao PIC foram iguais a zero.

O número médio de alelos encontrados para as populações foi de 4,166. O número de alelos efetivos para a população de Nilótica foi de 4,373 e foi igual a zero para a população de Chitralada (Tabela 5).

4. Discussão

Vários estudos vêm sendo feitos a fim de estimar a diversidade das tilápias (Romana-Eguia et al. (2004), Bhassu et al. (2004), Carleton et al. (2002)) principalmente para o monitoramento de programas de melhoramento e conservação do patrimônio genético.

Romana-Eguia et al. (2004) em um estudo utilizando marcadores de microssatélites, em onze populações de *O. niloticus* (tilápia NIFI, tilápia de Israel, quatro populações provenientes de programas de melhoramento – GIFT, GMT, FAC e a SEAFDEC, e cinco populações híbridas) obtiveram valores de $H_o = 0,560$ e $H_e = 0,702$ próximos aos encontrados no presente trabalho para a população de Chitralada (H_o : 0,471; H_e : 0,674).

Melo et al. (2006) encontram valores superiores (H_o : 0,610 e H_e : 0,602) em um estudo realizado com cinco *locus* de microssatélites em seis plantéis de tilápia (Ceará,

Chitralada, Israel, Nilótica, Taiwan e Vermelha) cultivadas na região Sudeste do Brasil. Valores elevados de heterozigosidade observada de 0,620 e esperada de 0,765 também foram obtidos com marcadores de microssatélite em um monitoramento de cinco gerações de programas de melhoramento para duas populações de tilápias: a tilápia nilótica, desenvolvida no SEAFDEC Aquaculture Department, e a Chitralada ou NIFI (Romana-Eguia et al., 2005).

Os maiores valores de H_o (0,702) e H_e (0,869) foram encontrados em populações selvagens de *O. niloticus* capturadas no Rio Nilo (Hassanien e Gilbey, 2005) e para cinco populações de tilápia (*O. niloticus* - Chitralada, Filipinas, Taiwan A e B, e *O. mossambicus*) da Malásia (H_o : 0,650 e H_e : 0,967) (Bhassu et al., 2004), ambos com marcadores de microssatélites.

Os valores de heterozigosidade encontrados para a população de nilótica no presente trabalho comprovam uma diminuição acentuada de variabilidade genética. Tal fato pode estar relacionado ao número reduzido de fundadores desta população quando da aquisição de matrizes pela CHESF (Companhia Hidroelétrica do São Francisco). Na Itália, um estudo desenvolvido com microssatélites em indivíduos de *Penaeus japonicus* das gerações F_1 a F_6 mostrou diminuição da heterozigosidade média de 0,102 para 0,039 (Sbordoni et al., 1986). No entanto, estes autores verificaram que a maior parte desta perda se deveu ao efeito de *bottleneck* nas gerações F_1 e F_2 , onde apenas quatro reprodutores da F_1 foram utilizados para produzir a F_2 .

Algumas limitações devem ser levadas em consideração quando análises de heterozigosidade são tidas como estimadores de variabilidade, pois o número e distribuição dos alelos são também importantes. Assim uma avaliação genética apropriada deve considerar ambos os parâmetros para se estimar a variabilidade real (Beardmore et al., 1997).

Os resultados do presente estudo referentes ao número de alelos (4,166) são

inferiores aos valores (7,8) encontrados por Romana-Eguia et al. (2004) com onze populações de cultivo de *O. niloticus* e também aos valores (11) encontrados por Bhasu et al. (2004) em cinco populações de cativeiro desta espécie. Rutten et al. (2004), por sua vez, encontraram valores semelhantes aos nossos (5,8 alelos por *locus*) em um estudo utilizando marcadores de microssatélite, com quatro linhagens cultivadas de *O. niloticus*.

O coeficiente F_{ST} permite caracterizar a distribuição da variabilidade genética entre populações (Rousset, 1996). O valor encontrado para a diferença genética entre as duas populações foi superior (0,627) ao descrito na literatura envolvendo linhagens de *O. niloticus*. Bhasu et al. (2004) encontrou um F_{ST} de 0,042, Rutten et al. (2004), de 0,204 e Romana-Eguia et al. (2004), de 0,058, tanto para populações naturais, como para populações cultivadas. Valores ainda menores $F_{ST} = 0,035$, foram encontrados por Hassanien e Gilbey (2005) para populações de tilápias selvagens capturadas no Egito.

O coeficiente de fixação F_{IS} é um parâmetro que permite caracterizar o nível de consangüinidade dentro das populações. Os valores encontrados no presente trabalho foram de 0,309, para a população de Chitralada e de 1,000 para a população de Nilótica. Estes valores são superiores aos descritos por Rutten et al. (2004) $F_{IS} = 0,041$ e Melo et al. (2006), $F_{IS} = 0,048$, para populações de *O. niloticus* domesticadas. Romana-Eguia et al. (2005) e Hassanien e Gilbey (2005) descreveram valores de 0,170 e 0,192 para populações de *O. niloticus* cultivadas e resultantes de programas de melhoramento, e para populações selvagens capturadas no Rio Nilo.

O resultado do coeficiente de fixação (F_{IS}) para a população de nilótica demonstra um alto nível de endogamia. Este fato pode estar relacionado ao reduzido número de indivíduos fundadores desta população e pela possibilidade de consangüinidade entre as matrizes adquiridas pela CHESF (Companhia Hidroelétrica do São Francisco) em 1984. Estes, juntamente com falta de cruzamentos desta população com populações externas

podem ser responsáveis pelo alto nível de endogamia.

O valor do coeficiente de consangüinidade ou endogamia igual a 1 demonstra que a população de *O. niloticus* possui máxima similaridade intrapopulacional decorrente da fixação de alelo para os três *loci* estudados. Segundo Falconer (1981), quando o coeficiente de consangüinidade é maior que 0,986, o que ocorre após 20 gerações de cruzamentos de irmãos-completos, a população pode ser classificada como sendo uma linhagem pura.

Linhagens altamente homozigotas para diferentes *loci* podem ser utilizadas para exploração do vigor híbrido F_1 (ou heterose) e para a obtenção de características desejáveis (Moreira, 2001, Dong e Yuan, 2002).

Linhagens altamente homozigotas ou isogênicas são bastante usadas em programas de melhoramento em aquicultura (Palti et al., 1997). Estudos envolvendo a análise de QTL ressaltam que a máxima eficiência desta abordagem depende da construção de linhagens isogênicas (Ozaki et al., 2001).

Devido à inexistência de diferentes alelos na população de *O. niloticus* para os três *loci*, é possível especular que esta população seja altamente homozigota e que possa ser utilizada na construção de uma linhagem isogênica.

6. Referências Bibliográficas

Appleyard, S.A., Mather, P.B., 2000. Investigation Into the Mode of Inheritance of Allozyme and Random Amplified Polymorphic DNA Markers in Tilapia *Oreochromis mossambicus*. *Aquac. Res.* 31, 435 – 445.

Bártfai, R., Egedi, S., Yue, G.H., Kovács, B., Urbányi, B., Tamás, G., Horváth, L., Orbán, L., 2003. Genetic analysis of two common carp broodstocks by rapd and microsatellite

markers. *Aquaculture*. 219, 157-167.

Bhassu, S., Yusoff, K., Panandam, M., Embong, W.K., Oyyan, S., Tan, S.G., 2004. The genetic structure of *Oreochromis* spp. (tilapia) populations in Malaysia as revealed by microsatellite DNA analysis. *Bioch.Gen.* 42, 217-229.

Beardmore, J. A., Mair, G. C., Lewis, R. I., 1997. Biodiversity in aquatic systems in relation to aquaculture. *Aquac. Res.* 28, 829-839.

Beardmore, A.R., Hoare, K., 2002. *Biotechnology and genetics in fisheries and aquaculture*. ed. Blackwell Science. 158 pp.

Carleton, K. L., Streelman, J. T., Lee, B.-Y., Garnhart, N., Kidd, M., Kocher, T. D. 2002., Rapid isolation of CA microsatellites from the tilapia genome *International Society for Animal Genetics*, *Animal Genet.* 33, 140-144.

Coimbra, M.R.M., Kobayashi, K., Koretsugu, S., Hasegawa, O., Ohara, E., Ozaki, A., Sakamoto, T., Naruse, K., Okamoto, N. 2003. A Genetic linkage map of the Japanese Flounder. *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*. 220 pp. 203 – 218.

Dong, Z.J., Yuan, X.H. 2002. The utilizations of heterosis in common carp in China. *Aquaculture*. Asia 7, 14-15.

Falconer, D. S. 1981. *Introduction to quantitative genetics*, 2nd. edition. London, New York: Longmans, 340pp.

FAO, 2004. Fishery statistics. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy. Disponível em: <<http://www.fao.org/fi/default.asp>> Acesso em 12 de Janeiro de 2007.

Hallerman, E.M. 2003. Population genetics: Principles and practices for fisheries scientists. American Fisheries Society, Bethesda, MD. 458 pp.

Hassanien, H. A., Gilbey, J. 2005. Genetic diversity and differentiation of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) revealed by DNA microsatellites. *Aquac. Res.* 36, 1450 - 1457.

Lee, W.J., Kocher, T.D. 1996. Microsatellite DNA markers for genetic mapping in the tilapia, *Oreochromis niloticus*, *J. Fish Biology* 49,169 -171.

Lutz, G. 2001. Practical Genetics for Aquaculture provides reviews of the fundamental theory and practical applications for genetic improvement in aquaculture. *World Aquaculture Society's (WAS)*, 246 pp.

Melo D.C., Oliveira D.A.A., Ribeiro L.P., Teixeira, C.S., Sousa A.B., Coelho, E.G.A., Crepaldi, D.V., Teixeira, E.A. 2006. Caracterização genética de seis plantéis comerciais de tilápia (*Oreochromis*) utilizando marcadores microssatélites. *Arq. Bra. Méd. Vet. Zoot.* 58, 87-93.

Moreira, H.L.M. 1999. Análise da estrutura de populações e diversidade genética e estoques de reprodutores de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) estimadas por microssatélite. Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 112pp.

Ozaki, A, Sakamoto, T., Khoo, S., Nakamura, K., Coimbra, M.R., Akutsu, T., Okamoto, N. 2001. Quantitative trait *loci* (QTLs) associated with resistance/susceptibility to infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Mol Genet Genomics 1, 23-31.

Palti, Y. 1997. Assessment of genetic variability among strains of rainbow and cutthroat trout using multilocus DNA fingerprints. Aquaculture 149. 47-56.

Raymond, M., Rousset, F. 1995. GENEPOP: population genetics software for exact tests and ecumenism, Ver. 3.4. J. Hered. 86, 248–249.

Ridha, M.T., 2006 “Comparative study of growth performance of three strains of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, L. at two stocking densities”. Aquac. Res. 37, 172-179.

Romana-Eguia, M.R.R., Ikedab, M., Basiaoa, Z.U., Taniguchib, N. 2004. Genetic diversity in farmed Asian Nile and red hybrid tilapia stocks evaluated from microsatellite and mitochondrial DNA. Aquaculture. 236, 131–150.

Romana-Eguia, M.R.R, Ikedab, M, Basiaoa, Z.U, Taniguchib, N. 2005. Genetic changes during mass selection for growth in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), assessed by microsatellites. Aquac. Res. 36, 69 -78.

Rousset, F. 1996. Equilibrium values of measure of populations subdivision for stepwise mutation process. Genetics 142, 1357-1362,

Rutten, M.J.M., Komen, H., Deerenberg, R.M., Siwek, M., Bovenhuis, H. 2004. Genetic characterization of four strains of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) using microsatellite markers. *Animal Genet.* 35, 93-97.

Sbordoni, V. 1986. Length variation in mtDNA control region in hatchery stocks of European sea bass subjected to acclimation experiments. *Genetics Selection Evolution* 30, 275-288.

Zimmermann, S. 1999. Incubação artificial. técnica permite a produção de tilápias do Nilo geneticamente superiores. *Panorama da Aquicultura*, Rio de Janeiro. 9, 15-21.

Wright, S. 1922. Coefficient of inbreeding and relationship. *American Naturalist*. 56, 330-338.

Tabela 1. Seqüência dos primers e repetições para os três *loci* de microssatélites analisados.

<i>Locus</i>	de	Primers <i>Reverse</i> e <i>Forward</i> (5'→3')	Entrada no	Autor
Microssatélite			NCBI	
UNH 123		Primer R: ATCATCACAGACAGATTAGA	G12276	Lee e
		Primer F: GATTGAGATTTCAATTCAAG		Kocher, 1996
UNH 106		Primer R: GTCTCTTTCTCTGTCACAAG	G12312	Lee e
		Primer F: CCTTCAGCATCCGTATAT		Kocher, 1996
UNH 190		Primer R: TGTCTGCACGCGCTTTTGT	G12342	Lee e
		Primer F: CGCGATCGAGCATTCTAA		Kocher, 1996

Tabela 2. Ciclos de temperatura utilizados na PCR.

Desnaturação Inicial	94° C por 4 minutos	
Desnaturação	94° C por 30 segundos	
Anelamento	Primer UNH 123 – 48° C por 30 segundos	
		35 Ciclos
	Primer UNH 106 - 52° C por 30 segundos	
	Primer UNH 190 - 54° C por 30 segundos	
Extensão	72° C por 1 minuto	
Extensão Final	72° C por 10 minutos	

Tabela 3. Frequência dos alelos para cada *locus* de microsatélite.

<i>Locus</i> de microsatélite	Frequências	
	Chitralada	Alélicas Nilótica
UNH 123		
Alelo (pb)		
188	0,634	0,000
210	0,244	1,000
220	0,122	0,000
UNH 106		
Alelo (pb)		
122	0,119	0,000
134	0,048	0,000
136	0,000	1,000
138	0,083	0,000
140	0,607	0,000
152	0,024	0,000
154	0,119	0,000
UNH 190		
Alelo (pb)		
160	0,041	0,000
162	0,135	0,000
164	0,014	0,000
166	0,054	0,000
168	0,189	0,000
170	0,054	0,000
172	0,068	0,000
174	0,095	0,000
176	0,140	0,000
180	0,162	0,000
182	0,081	0,000
184	0,095	1,000

Tabela 4. Número de alelos, tamanho esperado, tamanho encontrado para cada *locus* de microssatélite.

<i>Locus</i> de Microssatélite	Número de alelos	Tamanho esperado (pb)	Tamanho encontrado (pb)
UNH 123	3	197	180-220
UNH 106	7	134	120-160
UNH 190	12	167	150-190

Tabela 5. Variabilidade genética das populações de *O. niloticus* das duas populações para os três *loci* de microssatélites.^a

População	UNH 123	UNH 106	UNH 190	MÉDIA
Chitralada				
Nº de indivíduos	41	42	37	40
A	3	7	12	7,333
a_e	2,099	2,461	8,561	4,373
Ho	0,539	0,165	0,709	0,471
He	0,527	0,606	0,891	0,674
PIC	0,461	0,564	0,871	0,632
Nilótica				
Nº de indivíduos	44	42	41	42,333
A	1	1	1	1
a_e	0	0	0	0
Ho	0	0	0	0
He	0	0	0	0
PIC	0	0	0	0
Total de todas as populações				
Nº de indivíduos	85	84	78	82,333
Média n alelos	2	4	6,5	4,166
Média Ho	0,539	0,165	0,709	0,471
Média He	0,527	0,606	0,891	0,674
Média PIC	0,461	0,564	0,871	0,632

^a"A indica o número de alelos; a_e número de alelos efetivos; Ho, heterozigiosidade observada; He, heterozigiosidade esperada; PIC, conteúdo de informação polimórfica".

Tabela 6. Índices de Wright (F_{IS} e F_{ST}) para as duas populações de tilápia ^a

<i>Locus</i>	F_{IS}		F_{ST}
	Chitralada	Nilótica	
UNH 123	-0,012	1	0,657
UNH 106	0,724	1	0,697
UNH 190	0,217	1	0,527
Média	0,309	1	0,627

^aDados obtidos através do GENEPOP (Raymond e Rousset, 1995).

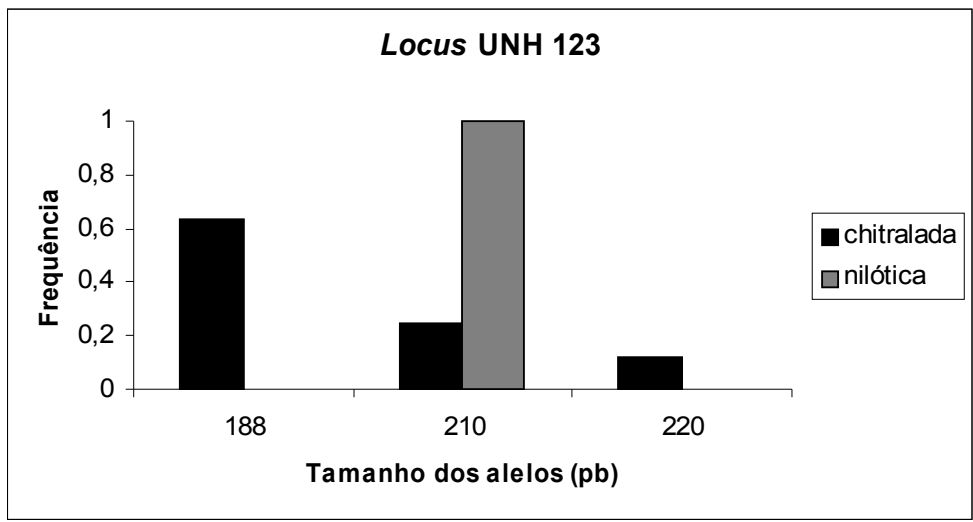


Figura 1. Histograma das freqüências dos alelos para o *locus* UNH 123.

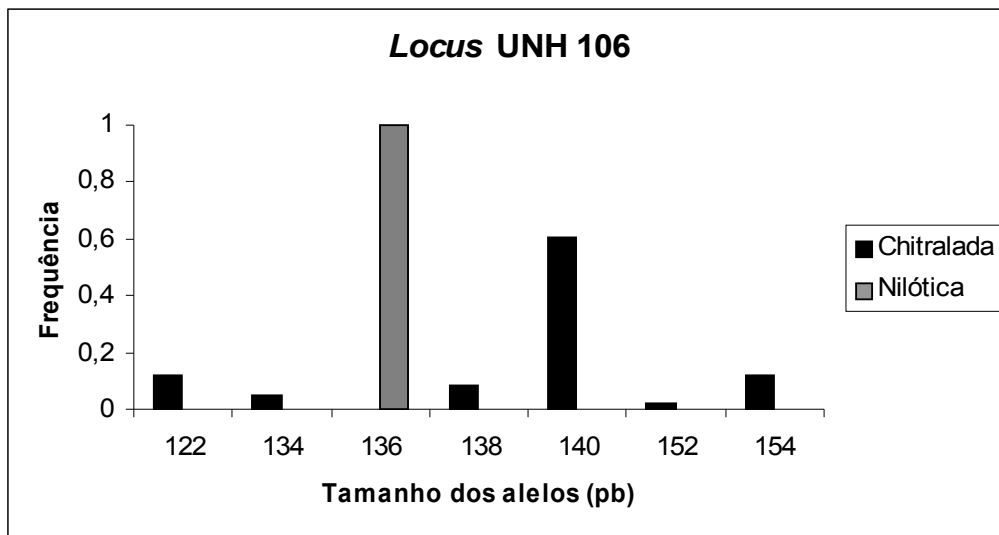


Figura 2. Histograma das freqüências dos alelos para o *locus* UNH 160.

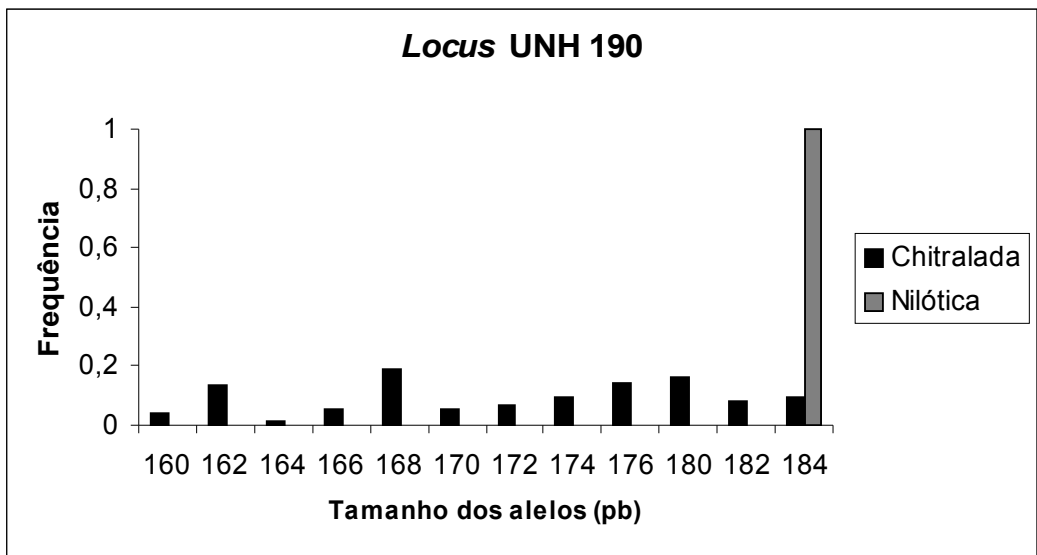


Figura 3. Histograma das frequências dos alelos para o *locus* UNH 190.

Considerações Finais

Os marcadores de microssatélites se mostraram ferramentas altamente informativas, no qual foi possível observar a variabilidade existente nas duas populações.

A população de tilápia Chitralada apresentou uma alta variabilidade quando comparada a população de *O. niloticus*.

A inexistência de polimorfismo na população de *O. niloticus* sugere que esta população é altamente homocigota, podendo ser utilizada na construção de uma linhagem isogênica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN TILAPIA ASSOCIATION, 2004. disponível em: <<http://ag.arizona.edu/azaqua/ata.html>> acesso em 15 de fevereiro de 2007.

APPLEYARD, S.A.; MATHER, P.B. Investgation into the made of inheritance of allozyme and random amplified polymorphic DNA markers in tilapia *Oreochromis mossambicus*. **Aquaculture Research** 31, 435 – 445. 2000.

Aptaregional disponível em: <http://www.aptaregional.sp.gov.br/artigo.php?id_artigo=278>. Acesso: em 15 de abril de 2007.

BÁRTFAI, R.; EGEDI, S.; YUE, G.H.; KOVÁCS, B.; URBÁNYI, B.; TAMÁS, G.; HORVÁTH, L.; ORBÁN, L. Genetic analysis of two common carp broodstocks by RAPD and microsatellite markers. **Aquaculture** 219, 157-167. 2003.

BHASSU, S.; YUSOFF, K.; PANANDAM, M.; EMBONG, W.K.; OYYAN, S.; TAN, S.G. The genetic structure of *Oreochromis* spp. (Tilapia) populations in malaysia as revealed by microsatellite DNA analysis. **Biochemical Genetics** 42, 217 –229, 2004.

BEARDMORE, J. A.; MAIR, G. C.; LEWIS, R. I. Biodiversity in aquatic systems in relation to aquaculture. **Aquaculture Research** 28, 829-839, 1997.

BEARDMORE, A.R.; HOARE, K. **Biotechnology and Genetics in Fisheries and Aquaculture**. ed. Blackwel Science, 158 pp, 2002.

BENTSEN, H. B.; EKNATH, A. E.; VERA, M. S. P.; DANTING, J. C.; BOLIVAR, H. L.; REYES, R. A.; DIONISIO, E. E.; LONGALONG, F. M.; CIRCA, A. V.; TAYAMEN, M. M.; GJERD, B. Genetic improvement of farmed tilapias: growth performance in a complete diallel cross experiment with eight strains of *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture**, Amsterdam, 160, 145 -173, 1998.

BORGHETTI, N. R. B.; OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J. R. **Aqüicultura: Uma visão geral sobre a produção de organismos aquáticos no Brasil e no mundo**. Curitiba:

Grupo integrado de aquicultura e estudos ambientais, 128 p. 2003.

BOSCOLO, W. R.; HAYASHI, C.; MEURER, F. Digestibilidade aparente da energia e nutrientes de alimentos convencionais e alternativos para a Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*, L.). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, 13, 539-545, 2002.

BOSCOLO, W. R. **Farinha de resíduos da indústria de filetagem de tilápia na alimentação da tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus***. Tese (Doutorado em zootecnia)-Departamento de Zootecnia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2003a.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLMICK, H. et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. **American Journal of Human Genetics**, 32, 314 - 331, 1980.

CARLETON, K. L.; STREELMAN, J. T.; LEE, B.Y.; GARNHART, N.; KIDD, M.; KOCHER, T. D. Rapid isolation of CA microsatellites from the tilapia genome International Society for Animal Genetics, **Animal Genetics**, 33, 140-144, 2002.

CARVALHO, G. R.; HAUSER, L. Molecular genetics and the stock concept in fisheries. In: **Molecular genetics in fisheries**. Carvalho, G.R., Pitcher, T.J. (eds.). Chapman and Hall, Londres, 55-79. 1995

COIMBRA, M.R.M.; KOBAYASHI, K.; KORETSUGU, S.; HASEGAWA, O.; OHARA, E.; OZAKI, A.; SAKAMOTO, T.; NARUSE, K.; OKAMOTO, N.; A genetic linkage map of the Japanese Flounder. *Paralichthys olivaceus*. **Aquaculture**, Holanda, 220, 203 – 218, 2003.

CURRAN, J. L. Human linkage mapping. Livro: **Genome mapping: A practical approachy**. Editado por: Raul H. Dear. Capítulo 1, 1 - 25, 1997.

DA SILVA, A.B.; MELO, F.R.; LOVSHIN, L.L. **Observações Preliminares Sobre a Cultura Monossexo da *Tilapia nilotica* Linnaeus (macho) em Viveiro, em Comparação com Híbridos Machos de Tilapia, com o Uso de Ração Suplementar e Fertilizantes**. Fortaleza: DNOCS, 8 p. 1975.

DONG, Z.J.; YUAN, X.H. The utilizations of heterosis in common carp in China. **Aquaculture Asia**, 7, 14-15, 2002.

DUNHAM, R. A.; R. O. SMITHERMAN, **Genetics and breeding of catfish**. Alabama Agricultural Experiment Station Southern Cooperative Series Bulletin 325, Auburn University, Auburn, AL. 20 p, 1987.

EDWARDS, A. ; CIVITCILLO, A ; HAMMOND, H. A e CASKEY. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric repeats. *American journal of human genetics* 49: 746-756, 1991.

EL-SAYED, A. F. M. Total replacement of fish meal with animal protein sources in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) feeds. **Aquaculture Research**, Oxford, 179, 275-280, 1998.

ESTATÍSTICA DA PESCA, 2004, disponível em: http://200.198.202.145/seap/pdf/cogesib/boletim_2004.pdf.> 13 de março de 2007.

FALCONER, D. S. **Introduction to quantitative genetics**, 2nd. edition. London, New York: Longmans, 340p, 1981.

FALCONER, D.S. **Introdução à genética quantitativa**. 1.ed. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa. 279p. 1987.

FAO, 2004. Disponível em: <http://www.fao.org/fi/default.asp> Acesso em 12 de Janeiro de 2007.

FUTUYMA, D.J. **Biologia evolutiva**. 2ª Edição. Sociedade Brasileira de genética, Ribeirão Preto. 631 p, 1992.

GODOY, M.P. **Criação de Peixe**. Pirassununga: Est. Exp. Biol. Piscicultura. 2ª ed. São Paulo. 24 p. 1959.

HALLERMAN, E.M. Population genetics: Principles and practices for fisheries scientists. **American Fisheries Society**, Bethesda, MD. 458 p. 2003.

HASSANIEN, H. A.; GILBEY, J. Genetic diversity and differentiation of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) revealed by DNA microsatellites. **Aquaculture Research**. 36, 1450 - 1457. 2005.

HANCOCK, J.M. Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. In **"Microsatellites: Evolution and Applications"** (D.B. Goldstein & C. Schlötterer, eds) (Oxford University Press), 1 - 9. 1999.

JEFFREYS A. J. ; WILSON, V. **Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA** Nature 314, 67 – 73. 1985.

LEE, W.J.; KOCHER, T.D. Microsatellite DNA markers for genetic mapping in the tilapia, *Oreochromis niloticus*, **Journal Fish Biology** 49,169-171, 1996.

LITT, M.; LUTY, J. A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics**, 44, 397-401, 1989.

LOVE, J. M., KNIGHT, A. M., MCALEER, M. A. & TODD, J. A. Towards construction of a high resolution map of the mouse genome using PCR-analysed microsatellites. **Nucleic Acids Research**. 8, 4123–4130. 1990.

LOVSHIN, L.L. **Red tilapia or Nile tilapia: Which is the best culture fish?** In: Simpósio Sobre Manejo e Nutrição de Peixes, 2., 1998, Piracicaba, SP. *Anais...* Piracicaba: [s.n.]. 179-198. 1998.

LUTZ, G. Practical Genetics for Aquaculture provides reviews of the fundamental theory

and practical applications for genetic improvement in aquaculture. **World Aquaculture Society's (WAS)**, 246 p. 2001.

LYNCH, M.; WALSH, B. Genetics and Analysis of Quantitative Traits. Sunderland, **Sinauer Associates**. 980p. 1998.

MEFFE G.K Conservation Genetics and the Management of Endangered Fishes **Fisheries**. 11, 14–23, 1986.

MELO D.C.; OLIVEIRA D.A.A. ; RIBEIRO L.P.; TEIXEIRA, C.S.; SOUSA A.B., COELHO, E.G.A., CREPALDI , D.V., TEIXEIRA, E.A. Caracterização genética de seis plantéis comerciais de tilápia (*Oreochromis*) utilizando marcadores microssatélites **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 58, 87-93, 2006.

MERCADO DA PESCA. Disponível em: <http://www.mercadodapesca.com.br>.> Acesso em: fevereiro de 2007.

MOREIRA, H.L.M. **Análise da estrutura de populações e diversidade genética e estoques de reprodutores de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) estimadas por microssatélite**. Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 112 p, 1999.

NAYLOR, R. L.; GOLDBURG, R. J.; PRIMAVERA, J. H.; KAUTSKY, N.; BEVERIDGE, M. C. M.; CLAY,J.; FOLKE, C.; LUBCHENCO, J.; MOONEY, H.; TROELL, M. Effect of aquaculture on world fish supplies. **Nature**, London, 405, 1017-1024, 2000.

OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J.R.; PEDINI, M. Situação atual da aqüicultura brasileira e mundial. In: VALENTI, W. C. Aqui no Brasil: Bases para um desenvolvimento sustentável. Brasília: CNPQ/MCT, 353-381, 2000.

OVENDEN, J. R. Mitochondrial DNA and marine stock assessment: a review. **Aust. Journal Marine. Freshwater Reseach**, 41, 835-853. 1990.

OZAKI, A; SAKAMOTO, T.; KHOO, S.; NAKAMURA, K.; COIMBRA, M.R.; AKUTSU, T.;

OKAMOTO, N. Quantitative trait *loci* (QTLs) associated with resistance/susceptibility to infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Molecular Genetic Genomics*, 1, 23-31. 2001.

PALTI, Y. Assessment of genetic variability among strains of rainbow and cutthroat trout using multilocus DNA fingerprints. ***Aquaculture***. 149, 47-56, 1997.

PARAN, I.; MICHELMORE, R.W. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. ***Theoretical Applied Genetic***, 85, 985-993, 1993.

RAYMOND, M. AND ROUSET, F. GENEPOP: population genetics software for exact tests and ecumenism, Ver. 3.4. ***Journal of Heredity***, 86, 248–249. 1995.

RIDHA M.T. “Comparative study of growth performance of three strains of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, L. at two stocking densities”. ***Aquaculture Research***. Vol. 37: 172-179. 2006.

ROMANA-EGUIA, M.R.R; IKEDAB, M; BASIAOA, Z.U; TANIGUCHIB, N. Genetic diversity in farmed Asian Nile and red hybrid tilapia stocks evaluated from microsatellite and mitochondrial DNA. ***Aquaculture***, 236, 131–150. 2004.

ROMANA-EGUIA, M.R.R; IKEDAB, M; BASIAOA, Z.U; TANIGUCHIB, N. Genetic changes during mass selection for growth in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), assessed by microsatellites. ***aquaculture research***, 36, 69 – 78, 2005.

ROUSSET, F. Equilibrium values of measure of populations subdivision for stepwise mutation process. ***Genetics***, 142, 1357-1362, 1996.

RUTTEN, M.J.M.; KOMEN, H.; DEERENBERG, R.M.; SIWEK, M.; BOVENHUIS, H. Genetic Characterization of Four Strains of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) Using Microsatellite Markers. ***Animal Genetics***, 35, 93-97. 2004.

SANO, T.; SMITH, C. L.; CANTOR, C. R. Dextroribonucleic acids as unique markers in molecular detection. ***Genetics analysis: Biomolecular Engineering***, v. 14, p. 37-40,

1997.

SBORDONI, V. Length variation in mtDNA control region in hatchery stocks of European sea bass subjected to acclimation experiments. **Genetics Selection Evolution**, 30, 275-288, 1986.

SILVA, A.L.N.; CHAMMAS, M.A. Current status of tilapia culture in Brazil. **World Aquaculture Society**, 350-351, 1997.

SUNNUCKS, P. Efficient tic markers for population biology. **Trends in ecology and evolution**, 15, 199 – 203. 2000.

TAUTZ, D. Hypervariability of Simple Sequences as a General Source for Polymorphic DNA Markers. **Nucleic Acids Research**, 17, 6464 – 6471. 1989.

STRASSMAN, J.E.; SOLIS C.R.; PETERS J.M.; QUELLER D.C.. Strategies for finding and using highly polymorphic DNA microsatellite *loci* for studies of genetic relatedness and pedigrees. “In” Molecular Methods in Zoology and evolution (eds. J.D.), 1996.

THORPE, J. P., SOLÉ-CAVA, A. M., WATTS, P. C. Exploited marine invertebrates: genetics and fisheries. **Hydrobiologia**, 420, 165-184. 2000.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZAUBER, M. AFLP: A New Technique for DNA Fingerprint. **Nucleic Acids Research**, 23, 4407 – 4414. 1995.

ZANE, L.; PATARNELLO, T.; LUDWIG, A.; FONTANA, F.; CONGIU, L. Isolation and characterization of microsatellites in the Adriatic sturgeon (*Acipenser naccarii*). **Molecular Ecology Notes**, 4, 586–588. 2002.

ZIMMERMANN, S. Incubação Artificial. Técnica Permite a Produção de Tilápias do Nilo Geneticamente Superiores. **Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro, 9, 15-21, 1999.

ZIMMERMANN, S. Um moderno instrumental genético no melhoramento e na rastreabilidade de tilápias nilóticas. **Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro, 13, 69 p,

2003.

WARD, R. D.. SOLÉ-CAVA, A.M., RUSSO, C.A.M., THORPE, J.P. Genetics in fisheries management. In: Marine genetics (eds). **Kluwer Academic Publishers**, Dordrecht, 191-201, 2000.

WARD, R.D.; JOMSTAD, K.E.; MAGUIRE, G.B. Microsatellite Diversity in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Introduced to Western Australia. **Aquaculture**, 219, 169 – 179, 2003.

WATANABE, W.O.; LOSORDO, T.M.; FITZSIMMONS, K.. Tilapia production systems in the Americas: technological advances, trend, and challenges. **Reviews in Fisheries Science**, 10, 465-498, 2002.

WEIR, B.S.; COCKERHAM, C.C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, Lawrence,38, 1358-1370, 1984.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A.; LIVAK, K.; RAFALSKY, J. A.; TINGEY, S. V. DNA Polimorphisms Amplified by Arbitrary Primers are Useful as Genetic Markers. **Nucleic Acids Reaserch**, 18, 6.531-6.535, 1990.

WRIGHT, S. Coeficient of Inbreeding and Relationship. **American Naturalist**, 56, 330-338, 1922.

ANEXOS

NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NO PERIÓDICO AQUACULTURE

Guide for Authors

Types of contribution

Original Research Papers should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form. *Review Articles* can cover either narrow disciplinary subjects or broad issues requiring interdisciplinary discussion. They should provide objective critical evaluation of a defined subject. Reviews should not consist solely of a summary of published data. Evaluation of the quality of existing data, the status of knowledge, and the research required to advance knowledge of the subject are essential.

Short Communications are used to communicate results which represent a major breakthrough or startling new discovery and which should therefore be published quickly. They should not be used for preliminary results. Papers must contain sufficient data to establish that the research has achieved reliable and significant results.

Technical Papers should present new methods and procedures for either research methodology or culture-related techniques.

The *Letters to the Editor* section is intended to provide a forum for discussion of aquacultural science emanating from material published in the journal.

Elsevier reserves the privilege of returning the author for revision accepted manuscripts and illustrations which are not in the proper form given in this guide.

Copyright

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all Authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the Publisher.

1. An author, when quoting from someone else's work or when considering reproducing an illustration or table from a book or journal article, should make sure that he is not infringing a copyright.
2. Although in general an author may quote from other published works, he should obtain permission from the holder of the copyright if he wishes to make substantial extracts or to reproduce tables, plates, or other illustrations. If the copyright-holder is not the author of the quoted or reproduced material, it is recommended that the permission of the author should also be sought.
3. Material in unpublished letters and manuscripts is also protected and must not be published unless permission has been obtained.
4. A suitable acknowledgement of any borrowed material must always be made.

If excerpts from other copyrighted works are included, the Author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by Authors in these cases: contact Elsevier's Rights Department, Oxford, UK: phone (+44) 1865 843830, fax (+44) 1865 853333, e-mail permissions@elsevier.com. Requests may also be completed online via the Elsevier homepage (☞ <http://www.elsevier.com/locate/permissions>).

Upon acceptance of an article, Authors will be asked to transfer copyright (for more information on copyright see ☞ <http://www.elsevier.com/copyright>). This transfer will ensure the widest possible dissemination of information.

Online submission to the journal prior to acceptance

Submission to **Aquaculture** proceeds totally on-line by way of an electronic submission system. By accessing the website ☞ <http://www.ees.elsevier.com/aqua> you will be guided stepwise through the creation and uploading of the various files. When submitting a manuscript to Elsevier Editorial System, authors need to provide an electronic version of their manuscript. For editing purpose original source files, not PDF files, are required should the manuscript be accepted. The author should specify a category designation for the manuscript (full length article, review article, short communication, etc.), choose a set of classifications from the prescribed list provided online and select an editor. Once the uploading is complete, the system automatically generates an electronic FDF (can be read by PDF readers) proof, which is then used for reviewing. Authors may provide the names of three potential referees in their covering letter. Authors may send queries concerning the

submission process, manuscript status, or journal procedures to the Editorial Office. They should avoid responding by messages received from the system using the 'Reply' button on their e-mail message; this will send the message to the system support and not to the editorial office, and will create unnecessary load of sorting out and forwarding. All correspondence, including the Editor's decision and request for revisions, will be by e-mail.

Papers for consideration should be submitted via the website mentioned above to the appropriate Section Editor:

Nutrition:

R. P. Wilson

Husbandry and Management:

B. Costa-Pierce

Physiology and Endocrinology:

E.M. Donaldson

Diseases:

D.J. Alderman

Genetics: G. Hulata

English language

Manuscripts should be written in English. Authors who are unsure of correct English usage should have their manuscript checked by someone proficient in the language. Manuscripts in which the English is difficult to understand may be returned to the author for revision before scientific review. Authors who require information about language editing and copy editing services pre- and post-submission please visit [↗](#)

<http://www.elsevier.com/wps/find/authorshome.authors/languagepolishing> or contact authorsupport@elsevier.com for more information. Please note Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our Terms & Conditions [↗](#)

http://www.elsevier.com/wps/find/termsconditions.cws_home/termsconditions

Format requirements for accepted articles

General

1. Manuscripts should be typewritten, with numbered lines, with wide margins and double spacing throughout, i.e. also for abstracts, footnotes and references. Every page of the manuscript, including the title page, references, tables, etc. should be numbered in the upper right-hand corner. However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary, one may refer to sections. Avoid excessive usage of italics to emphasize part of the text.

2. Manuscripts in general should be organized in the following order:

Title (should be clear, descriptive and concise)

Name(s) of author(s)

Complete postal address(es) of affiliations

Full telephone and fax number and E-mail address of the corresponding author

Present address(es) of author(s) if applicable

Abstract

Keywords (indexing terms), normally 3-6 items.

Introduction

Material studied, area descriptions, methods, techniques

Results

Discussion

Conclusion

Acknowledgements and any additional information concerning research grants, etc.

References

Tables

Figure captions

3. In typing the manuscript, titles and subtitles should not be run within the text. They should be typed on a separate line, without indentation. Use bold face, lower-case letter type for titles; use non-bold, italic letter type for sub-titles. Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ?), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to "the text".

4. Species names and other Latin terms should be typed in italics.

5. SI units should be used.

6. It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. Do not embed "graphically designed" equations or tables, but prepare these using the word processor's facility. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Author Gateway's Guide to Publishing with Elsevier: <http://authors.elsevier.com>). Do not import the figures into the text file but, instead, indicate their approximate locations directly in the electronic text. See also the section on Preparation of electronic illustrations.

LaTeX documents

The article should preferably be written using Elsevier's document class "elsart", or alternatively the standard document class "article".

The Elsevier LaTeX package (including detailed instructions for LaTeX preparation) can be obtained from the Author Gateway's Quickguide: <http://authors.elsevier.com/latex>. It consists of the files: elsart.cls, guidelines for users of elsart, a template file for quick start, and the instruction booklet "Preparing articles with LaTeX".

Abstracts

The abstract should be clear, descriptive and not longer than 400 words. It should provide a very brief introduction to the problem and a statement about the methods used in the study. This should generally be followed by a brief summary of results, including numerical data (means and standard errors, for example). The abstract should end with an indication of the significance of the results. An abstract is often presented separate from the article, so it must be able to stand alone. References should therefore be avoided, but if essential, they must be cited in full, without reference to the reference list. Non-standard or

uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 4-6 keywords, avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field at their first occurrence in the article: in the abstract but also in the main text after it. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Tables

1. Authors should take notice of the limitations set by the size and lay-out of the journal. Large tables should be avoided. Reversing columns and rows will often reduce the dimensions a table.
2. If many data are to be presented, an attempt should be made to divide them over two or more tables.
3. Tables should be numbered according to their sequence in the text. The text should include references to all tables.
4. Each table should be typewritten on a separate page of the manuscript. Tables should never be included in the text.
5. Each table should have a brief and self-explanatory title.
6. Column headings should be brief, but sufficiently explanatory. Standard abbreviations of units of measurement should be added between parentheses.
7. Vertical lines should not be used to separate columns. Leave some extra space between the columns instead.
8. Any explanation essential to the understanding of the table should be given as a footnote at the bottom of the table.

Formulae Present simple formulae in the line of normal text where possible. In principle, variables are to be presented in italics. Use the solidus (/) instead of a horizontal line, e.g., X/Y

Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separate from the text (if referred to explicitly in the text). Give the meaning of all symbols immediately after the equation in which they are first used. In chemical formulae, valence of ions should be given as, e.g. Ca²⁺ and not Ca⁺⁺. Isotope numbers should precede the symbols, e.g., ¹⁸O. The repeated writing of chemical formulae in the text is to be avoided where reasonably possible; instead, the name of the compound should be given in full. Exceptions may be made in the case of a very long name occurring very frequently or in the case of a compound being described as the end product of a gravimetric determination (e.g., phosphate as P₂O₅).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves on a separate sheet at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Preparation of electronic illustrations

General

1. Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
2. Save text in illustrations as "graphics" or enclose the font.
3. Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Helvetica, Times, Symbol.
4. Number the illustrations according to their sequence in the text.
5. Use a logical naming convention for your artwork files.
6. Provide all illustrations as separate files.
7. Provide captions to illustrations separately.
8. Produce images near to the desired size of the printed version.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website: <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please "save as" or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as "graphics".

TIFF: Colour or greyscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (colour or greyscale): a minimum of 500 dpi is required.

DOC, XLS or PPT: If your electronic artwork is created in any of these Microsoft Office applications please supply "as is".

Please do not:

1. embed graphics in your word processor (spreadsheet, presentation) document;
2. supply files that are optimised for screen use (like GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
3. supply files that are too low in resolution;
4. submit graphics that are disproportionately large for the content.

Captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Line drawings

The lettering and symbols, as well as other details, should have proportionate dimensions, so as not to become illegible or unclear after possible reduction; in general, the figures should be designed for a reduction factor of two to three. The degree of reduction will be determined by the Publisher. Illustrations will not be enlarged. Consider the page format of the journal when designing the illustrations. Do not use any type of shading on computer-generated illustrations.

Photographs (halftones)

Remove non-essential areas of a photograph. Do not mount photographs unless they form part of a composite figure (plate). Where necessary, insert a scale bar in the illustration (not below it), as opposed to giving a magnification factor in the caption.

Colour illustrations

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable colour figures, then Elsevier will ensure, at no additional charge that these figures will appear in colour on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. For colour reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for colour in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting colour figures to "grey scale" (for the printed version should you not opt for colour in print) please submit in addition usable black and white versions of all the colour illustrations. As only one figure caption may be used for both colour and black and white versions of figures, please ensure that the figure captions are meaningful for both versions, if applicable.

References

1. All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. The manuscript should be carefully checked to ensure that the spelling of author's names and dates are exactly the same in the text as in the reference list.

2. In the text refer to the author's name (without initial) and year of publication, followed - if necessary - by a short reference to appropriate pages. Examples: "Since Peterson (1993) has shown that..." "This is in agreement with results obtained later (Kramer, 1994, pp. 12-16)".

3. If reference is made in the text to a publication written by more than two authors the name of the first author should be used followed by "et al.". This indication, however, should never be used in the list of references. In this list names of first author and all co-authors should be mentioned.

4. References cited together in the text should be arranged chronologically. The list of references should be arranged alphabetically by authors' names, and chronologically per author. If an author's name in the list is also mentioned with co-authors the following order should be used: publications of the single author, arranged according to publication dates - publications of the same author with one co-author - publications of the author with more than one co-author. Publications by the same author(s) in the same year should be listed as 1994a, 1994b, etc.

5. Use the following system for arranging your references:

a. For periodicals

Dame, R., Libes, S., 1993. Oyster reefs and nutrient retention in tidal creeks. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 171, 251-258.

a. For edited symposia, special issues, etc. published in a periodical

Benzie, J.A.H., Ballment, E., Frusher, S., 1993. Genetic structure of *Penaeus monodon* in Australia: concordant results from mtDNA and allozymes. In: Gall, G.A.E., Chen, H. (Eds.), *Genetics in Aquaculture IV. Proceedings of the Fourth International Symposium, 29 April-3 May 1991, Wuhan, China.* *Aquaculture* 111, 89-93.

c. For books

Gaugh, Jr., H.G., 1992. *Statistical Analysis of Regional Yield Trials.* Elsevier, Amsterdam, 278 pp.

d. For multi-author books

Shigueno, K., 1992. Shrimp culture industry in Japan. In: Fast, A.W., Lester, L.J. (Eds.), *Marine Shrimp Culture: Principles and Practices.* Elsevier, Amsterdam, pp. 641-652.

6. Titles of periodicals mentioned in the list of references should be abbreviated following ISO 4 standard. The ISSN word abbreviations, for example, can be found at <http://www.issn.org/lstwa.html>.

7. In the case of publications in any language other than English, the original title is to be retained. However, the titles of publications in non-Latin alphabets should be transliterated, and a notation such as "(in Russian)" or "(in Greek, with English abstract)" should be added.

8. Papers accepted for publication but not yet published should be referred to as "in press".

9. References concerning unpublished data and "personal communications" should not be

cited in the reference list but may be mentioned in the text.

Use of the Digital Object Identifier

The digital object identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly "Articles in press" because they have not yet received their full bibliographic information. The correct format for citing a DOI is shown as follows (example taken from a document in the journal *Physics Letters B*):

doi:10.1016/j.physletb.2003.10.071

When you use the DOI to create URL hyperlinks to documents on the web, they are guaranteed never to change. However, please check the DOI very carefully as an error in a letter or number will result in a dead link.

GenBank/DNA sequence linking

DNA sequences and GenBank Accession numbers. Many Elsevier journals cite "gene accession numbers" in their running text and footnotes. Gene accession numbers refer to genes or DNA sequences about which further information can be found in the databases at the National Center for Biotechnical Information (NCBI) at the National Library of Medicine. Authors are encouraged to check accession numbers used very carefully. **An error in a letter or number can result in a dead link.** Note that in the final version of the *electronic copy*, the accession number text will be linked to the appropriate source in the NCBI databases enabling readers to go directly to that source from the article.

Example 1: "GenBank accession nos. **AI631510**, **AI631511**, **AI632198**, and **BF223228**), a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. BE675048), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. **AA361117**)".

Authors are encouraged to check accession numbers used very carefully. An error in a letter or number can result in a dead link.

In the final version of the printed article, the accession number text will not appear bold or underlined (see Example 2 below).

Example 2: "GenBank accession nos. AI631510, AI631511, AI632198, and BF223228), a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. BE675048), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. AA361117)".

In the final version of the electronic copy, the accession number text will be linked to the appropriate source in the NCBI databases enabling readers to go directly to that source from the article (see Example 3 below).

Example 3: "GenBank accession nos. AI631510, AI631511, AI632198, and BF223228), a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. BE675048), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. AA361117)".

Nomenclature

1. Authors and editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the International Code of Botanical Nomenclature, the International Code of Nomenclature of Bacteria, and the International Code of Zoological Nomenclature.
2. All botica (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals.
3. All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.
4. For chemical nomenclature, the conventions of the International Union of Pure and Applied Chemistry and the official recommendations of the IUPAC IUB Combined Commission on Biochemical Nomenclature should be followed.

Preparation of supplementary data

Elsevier accepts supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the Author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: [☞](#)

<http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data is provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

After acceptance

Proofs

One set of proofs will be sent to the corresponding author as given on the title page of the manuscript. Only typesetter's errors may be corrected; no changes in, or additions to, the edited manuscript will be allowed.

Reprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail or, alternatively, 25 free paper offprints. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

Additional offprints can be ordered on a print order form, which is included with the proofs. UNESCO coupons are acceptable in payment of extra offprints.

Author's Discount

There is a 30% discount on all Elsevier book publications. An order form will be sent together with the proofs.

Author Services

Authors can also keep a track on the progress of their accepted article, and set up e-mail alerts informing them of changes to their manuscript's status, by using the "Track a Paper" feature of Elsevier's Author Gateway.

Aquaculture has no page charges.

Illustrations

1. All illustrations (line drawings and photographs) should be submitted separately, unmounted and not folded.

2. Illustrations should be numbered according to their sequence in the text. References should be made in the text to each illustration.
3. Each illustration should be identified on the reverse side (or – in the case of line drawings – on the lower front side) by its number and the name of the author. An indication of the top of the illustrations is required in photographs of profiles, thin sections, and other cases where doubt can arise.
4. Illustrations should be designed with the format of the page of the journal in mind. Illustrations should be of such a size as to allow a reduction of 50%.
5. Lettering should be clear and large enough to allow a reduction of 50% without becoming illegible. The lettering should be in English. Use the same kind of lettering throughout and follow the style of the journal.
6. If a scale should be given, use bar scales on all illustrations instead of numerical scales that must be changed with reduction.
7. Each illustration should have a caption. The captions to all illustrations should be typed on a separate sheet of the manuscript.
8. Explanations should be given in the typewritten legend. Drawn text in the illustrations should be kept to a minimum.
9. Photographs are only acceptable if they have good contrast and intensity. Sharp and glossy copies are required. Reproductions of photographs already printed cannot be accepted.
10. Colour illustrations can be included if the cost of their reproduction is paid for by the author. For details of the costs involved, please contact the publisher at: ninfo-f@elsevier.com.

Formulae

1. Formulae should be typewritten, if possible. Leave ample space around the formulae.
2. Subscripts and superscripts should be clear.
3. Greek letters and other non-Latin or handwritten symbols should be explained in the margin where they are first used. Take special care to show clearly the difference between zero (0) and the letter O, and between one (1) and the letter I.
4. Give the meaning of all symbols immediately after the equation in which they are first used.
5. For simple fractions use the solidus (/) instead of a horizontal line.
6. Equations should be numbered serially at the right-hand side in parentheses. In general only equations explicitly referred to in the text need be numbered.

7. The use of fractional powers instead of root signs is recommended. Also powers of e are often more conveniently denoted by \exp .
8. Levels of statistical significance which can be mentioned without further explanation are * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$.
9. In chemical formulae, valence of ions should be given as, e.g. Ca^{2+} and not Ca^{++} .
10. Isotope numbers should precede the symbols, e.g., ^{18}O .
11. The repeated writing of chemical formulae in the text is to be avoided where reasonably possible; instead, the name of the compound should be given in full. Exceptions may be made in the case of a very long name occurring very frequently or in the case of a compound being described as the end product of a gravimetric determination (e.g., phosphate as P_2O_5).

Footnotes

1. Footnotes should only be used if absolutely essential. In most cases it should be possible to incorporate the information in normal text.
2. If used, they should be numbered in the text, indicated by superscript numbers, and kept as short as possible.

Nomenclature

1. Authors and editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the *International Code of Botanical Nomenclature*, the *International Code of Nomenclature of Bacteria*, and the *International Code of Zoological Nomenclature*.
2. All botica (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals.
3. All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.
4. For chemical nomenclature, the conventions of the *International Union of Pure and Applied Chemistry* and the official recommendations of the *IUPAC IUB Combined Commission on Biochemical Nomenclature* should be followed.

Copyright

1. An author, when quoting from someone else's work or when considering reproducing an

illustration or table from a book or journal article, should make sure that he is not infringing a copyright.

2. Although in general an author may quote from other published works, he should obtain permission from the holder of the copyright if he wishes to make substantial extracts or to reproduce tables, plates, or other illustrations. If the copyright-holder is not the author of the quoted or reproduced material, it is recommended that the permission of the author should also be sought.

3. Material in unpublished letters and manuscripts is also protected and must not be published unless permission has been obtained.

4. A suitable acknowledgement of any borrowed material must always be made.

Proofs

One set of proofs will be sent to the corresponding author as given on the title page of the manuscript. Only typesetter's errors may be corrected; no changes in, or additions to, the edited manuscript will be allowed.

Offprints

1. Twenty-five offprints will be supplied free of charge.

2. Additional offprints can be ordered on an offprint order form, which is included with the proofs.

3. UNESCO coupons are acceptable in payment of extra offprints.

Author Services

Authors can also keep a track on the progress of their accepted article, and set up e-mail alerts informing them of changes to their manuscript's status, by using the "Track a Paper" feature of Elsevier → <http://authors.elsevier.com>.