

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
(UNESP)
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP
(CAUNESP)**

**Avaliação de parâmetros genéticos para
resistência à *Francisella orientalis* (FO) em
tilápia (*Oreochromis niloticus*)**

Jairo Alberto Restrepo Arango

Jaboticabal, São Paulo
2025

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
(UNESP)
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP
(CAUNESP)**

**Avaliação de parâmetros genéticos para
resistência à *Francisella orientalis* (FO)
em tilápia (*Oreochromis niloticus*)**

Jairo Alberto Restrepo Arango

Orientador: Dr. Diogo Teruo Hashimoto

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Aquicultura, Centro de Aquicultura da UNESP - CAUNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Jaboticabal, São Paulo.
2025.

A662a Arango, Jairo Alberto Restrepo
Avaliação de parâmetros genéticos para resistência à
Francisella orientalis (FO) em Tilápia (*Oreochromis niloticus*) /
Jairo Alberto Restrepo Arango. -- , 2025
65 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
(UNESP), Centro de Aquicultura da Unesp, Jaboticabal,
Orientador: Diogo Hashimoto

1. Francisella orientalis. 2. Breeding programs. 3. Heritability.
4. Genetic gains. 5. Nile tilapia genetic. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Centro de Aquicultura da Unesp, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.


CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Avaliação de parâmetros genéticos para resistência à *Francisella orientalis* (FO) em tilápia (*Oreochromis niloticus*)


AUTOR: JAIRO ALBERTO RESTREPO ARANGO

ORIENTADOR: DIOGO TERUO HASHIMOTO


Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciências, Área de Aquicultura, pela Comissão Examinadora:

Documento assinado digitalmente
 **DIOGO TERUO HASHIMOTO**
Data: 27/02/2025 08:26:28-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. DIOGO TERUO HASHIMOTO (Participação Virtual)
Laboratório de Genética / CAUNESP- Jaboticabal/SP

Documento assinado digitalmente
 **INACIO MATEUS ASSANE**
Data: 26/02/2025 17:58:58-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.Dr. INÁCIO MATEUS ASSANE (Participação Virtual)
Faculdade de Ciências Agrárias / Universidade Zambeze, Beira/Moçambique

Documento assinado digitalmente
 **CAIO AUGUSTO PERAZZA**
Data: 26/02/2025 18:07:43-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Pós doutorando CAIO AUGUSTO PERAZZA (Participação Virtual)
Instituto Oceanográfico / Universidade de São Paulo

Jaboticabal, 27 de fevereiro de 2025

Apoio Financeiro.

Agradeço ao CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo auxílio concebido (170132/2023-4)

Agradeço a FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo. (2021/11955-8)

Agradecimentos.

Gostaria de expressar minha gratidão a todas as pessoas que contribuíram para minha formação como MSc. À minha família pelo apoio incondicional, especialmente ao meu pai, que esteve sempre presente e envolvido no meu processo. À minha namorada, por estar ao meu lado em cada etapa e ser um suporte essencial.

Aos colegas do laboratório (LaGeAc), em especial a Jhon, que me incentivou a iniciar o mestrado e me acolheu como parte da família; Baltasar, por compartilhar essa trajetória e se tornar um verdadeiro irmão brasileiro; Celma e Arno, por ensinarem com dedicação e generosidade; e Vito, pela paciência ao me ajudar com a escrita em português.

Ao meu orientador, Diogo, não apenas por me transmitir conhecimentos em aquicultura e genética, mas também por me ensinar como funciona uma organização e, mais importante ainda, por me proporcionar um aprendizado essencial: o crescimento pessoal. Graças a ele, compreendi o valor da paciência e da confiança na realização de projetos. No laboratório, adquiri conhecimentos técnicos, mas, acima de tudo, aprendi que o bem-estar, a escuta e o planejamento são aspectos fundamentais que vão além da disciplina.

Sumario

1. Introdução Geral.	6
1.1 Produção Aquícola e da tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) no mundo. ...	6
1.2 Aquicultura brasileira e tilapicultura nacional	7
1.3 A tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) e o melhoramento genético no Brasil.	10
1.4 Melhoramento genético para a resistência a doenças em tilápia do Nilo	11
1.5 <i>Francisella orientalis</i>.	13
1.6 Melhoramento genético para <i>francisella orientalis</i>.	16
1.7 Ganho genético	17
1.8 Referências	19
2 Objetivos	27
2.1 Objetivo Geral:	27
2.2 Objetivos Específicos:	27
1. Abstract	30
2. Introduction	31
3. Material and methods	33
3.1 Ethic statement	33
3.2 Origin of animals, reproduction and production of G0	33
3.3 First challenge with <i>F. orientalis</i>	36
3.4 Genetic parameters estimation and production of G1.	39
3.5 Second challenge	40
3.6 Response to selection (ΔG)	41
4 Results	42
4.1 Experimental challenges	42
4.2 Genetic parameters and response to selection (ΔG)	43
5 Discussion	47
6 Conclusion	50
7 References	52

Resumo geral.

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é uma das principais espécies cultivadas e de grande relevância para a aquicultura brasileira. No entanto, a sanidade tem sido uma importante limitação para sua produção, devido ao surgimento de doenças emergentes que causam altas taxas de mortalidade, o que acarreta perdas econômicas significativas. Entre os principais patógenos, encontra-se a bactéria intracelular gram-negativa *Francisella orientalis* (FO), responsável por causar doenças granulomatosas sistêmicas, resultando em mortalidades em massa de até 90% da produção. Apesar da gravidade do problema, ainda não existem vacinas comerciais disponíveis para prevenir ou tratar essa doença, o que ressalta a importância da melhoria genética como uma alternativa sustentável para aumentar a resistência contra esse patógeno. Os objetivos deste estudo foram estimar os parâmetros genéticos para resistência contra FO e o ganho genético. Para isso, realizamos dois desafios em duas gerações consecutivas (G0 e G1) para avaliar a resistência à bactéria. No primeiro desafio (G0), foram utilizadas 66 famílias, enquanto no segundo desafio (G1), foram empregadas 106 famílias selecionadas e 6 famílias de controle. A infecção foi induzida por meio de inoculação intraperitoneal com uma dose pré-estabelecida da bactéria, definida através de um experimento de dose letal (DL75). Os desafios contra FO foram realizados durante 21 dias, período no qual foram avaliadas características de resistência, como a taxa de sobrevivência e o tempo até a morte; com resultados médios de TD (tempo até a morte) foram menores em G1 do que em G0, sendo $56,59 \pm 17,27$ e $73,70 \pm 27,68$ horas, respectivamente. A resposta à seleção (ΔG_R) foi estimada utilizando a característica de sobrevivência binária. A resposta esperada à seleção (ΔG_E) também foi estimada usando os parâmetros genéticos da característica TD no segundo desafio. As estimativas de h^2 para G0, G1 e G0+G1 foram $0,399 \pm 0,07$, $0,282 \pm 0,08$ e $0,593 \pm 0,07$ para TD, e $0,470 \pm 0,08$, $0,295 \pm 0,08$ e $0,517 \pm 0,06$ para BS (sobrevivência binária). Os valores de ΔG_R a nível de família foram -0,144 para o controle G1, -0,0638 para G0 e 0,0122 para a resistência G1, indicando um efeito positivo da seleção para resistência. O ΔG_E mostrou ganhos genéticos potenciais de 33 a 109 horas em TD para a próxima geração, dependendo da intensidade da seleção. Os resultados obtidos nos permitiram iniciar uma linhagem geneticamente resistente a *F. orientalis*. Este avanço será fundamental para promover o desenvolvimento sustentável da cadeia de produção de tilápia na aquicultura brasileira.

General Abstract.

The Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) is one of the main species cultivated and of great relevance to Brazilian aquaculture. However, fish health has been a significant limitation to its production due to the emergence of diseases that cause high mortality rates, leading to considerable economic losses. Among the main pathogens, the gram-negative intracellular bacterium *Francisella orientalis* (FO) is responsible for causing systemic granulomatous diseases, resulting in mass mortalities of up to 90% of production. Despite the severity of the problem, there are currently no commercially available vaccines to prevent or treat this disease, highlighting the importance of genetic improvement as a sustainable alternative to increase resistance to this pathogen. The objectives of this study were to estimate the genetic parameters for resistance to FO and genetic gain. To this end, two challenges were conducted over two consecutive generations (G0 and G1) to evaluate resistance to the bacterium. In the first challenge (G0), 66 families were used, while in the second challenge (G1), 106 selected families and 6 control families were employed. Infection was induced by intraperitoneal inoculation with a pre-established dose of the bacterium, defined through a lethal dose experiment (DL75). The challenges against FO were carried out over 21 days, during which resistance traits such as survival rate and time to death were assessed. The mean results for time to death (TD) were lower in G1 than in G0, with values of 56.59 ± 17.27 hours and 73.70 ± 27.68 hours, respectively. The response to selection (ΔGR) was estimated using the binary survival trait. The expected response to selection (ΔGE) was also estimated using the genetic parameters of the TD trait in the second challenge. The heritability estimates (h^2) for G0, G1, and G0+G1 were 0.399 ± 0.07 , 0.282 ± 0.08 , and 0.593 ± 0.07 for TD, and 0.470 ± 0.08 , 0.295 ± 0.08 , and 0.517 ± 0.06 for binary survival (BS), respectively. The ΔGR values at the family level were -0.144 for the G1 control, -0.0638 for G0, and 0.0122 for G1 resistance, indicating a positive effect of selection for resistance. ΔGE showed potential genetic gains of 33 to 109 hours in TD for the next generation, depending on the intensity of selection. The results obtained allowed the initiation of a genetically resistant lineage to *F. orientalis*. This advancement will be crucial for promoting the sustainable development of the tilapia production chain in Brazilian aquaculture.

1. Introdução Geral.

1.1 Produção Aquícola e da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) no mundo.

A demanda por peixes tem aumentado durante as últimas décadas, devido ao crescimento populacional e à busca por fontes alimentares mais saudáveis. De acordo com a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO, 2022), a aquicultura tornou-se fundamental para abastecer uma população mundial que se estima atingir 9,7 bilhões de pessoas em 2050, o que representa 2 bilhões ou 25% a mais do que a população registrada em 2020. No entanto, a sustentabilidade da atividade aquícola será essencial para que as demandas futuras de alimentos sejam atendidas de forma contínua e organizada (Carneiro, 2019). A produção aquícola mundial aumentou rapidamente desde a década de 1950, enquanto a produção pesqueira de captura mundial não apresentou uma tendência de aumento após o início da década de 1990. A produção aquícola superou a produção pesqueira de captura para consumo humano em 2016 (FAO, 2020) e contribuiu com 52% da proporção total da produção de animais aquáticos para consumo humano em 2018 (FAO, 2020). No período de 1990 a 2020, a aquicultura mundial experimentou uma expansão de 609% na sua produção anual, com uma taxa média de crescimento de 6,7% ao ano (FAO, 2022). Em 2020, a produção aquícola totalizou 87,5 milhões de toneladas de animais, principalmente para a consumo humano (FAO, 2022).

Tilápia é o nome comum de mais de 70 espécies da família Cichlidae, nativas da África e do Oriente Médio. O gênero *Tilapia* foi descrito pela primeira vez por Smith, 1940. Ele consiste em três subgêneros que se distinguem taxonomicamente por seu comportamento reprodutivo e hábitos alimentares: *Tilapia* (desovadores biparentais e em substrato), *Oreochromis* (fêmeas incubadoras bucais) e *Sarotherodon* (incubadoras bucais biparentais). São principalmente herbívoros e alimentam-se principalmente de fitoplâncton ou outra vegetação aquática, mas aceitam facilmente alimentos artificiais completos que contêm proteínas vegetais e/ou animais (El-Sayed,

2019). A tilápia é um dos peixes com maior potencial para a piscicultura por diversas características, como a aceitação do mercado consumidor, possuir carne branca com textura firme e fácil filetagem, sabor delicado, e não possuir espinhas intramusculares. Em relação ao seu potencial de produção, a tilápia ainda apresenta características produtivas desejáveis na aquicultura, como altas taxas de crescimento e adaptabilidade à diversas condições de produção.

A tilápia é a segunda espécie mais cultivada atualmente no mundo, depois apenas das carpas (FAO, 2022). A produção mundial anual de tilápia cultivada aumentou de menos de 200.000 toneladas métricas (TM) em 1984 para mais de seis milhões de TM em 2021 (FAO, 2022). A tilápia do Nilo é cultivada em 140 países e o mercado global de tilápia foi avaliado em US\$ 12 bilhões em 2018 esperando-se que alcance US\$ 25 bilhões até o final de 2028 (FAO, 2018). A China tem sido o maior produtor, consumidor e exportador de tilápia do mundo. Sua produção tem aumentado de 0,12 milhão de toneladas em 1991 para 1,66 milhão de toneladas em 2020, com uma taxa média de crescimento anual de 9,48% (Dai et al., 2022). A produção de tilápia na América Latina vem apresentando continuada expansão, principalmente devido à exportação de filés para os Estados Unidos. Embora Colômbia e Brasil continuam sendo os maiores fornecedores de filés de tilápia resfriados para os americanos, o Brasil tem recebido cada vez mais destaque com uma produção quase que totalmente voltada para o exterior (FAO, 2024).

Aquicultura brasileira e tilapicultura nacional

Em 2022, a aquicultura no Brasil atingiu uma produção de 617,3 mil toneladas, o que representou um aumento de 6,4% em comparação ao ano anterior (IBGE, 2022). Esse crescimento foi impulsionado principalmente pela produção de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), com sua produção crescendo rapidamente desde 2008 um

aumento acumulado de 225% (FAO, 2021); que somou 408,4 mil toneladas, correspondendo a 66,1% do total produzido nacional, e representando cerca de 5,7% da produção global, consolidando-se como um dos maiores produtores mundiais (FAO, 2021). As espécies nativas, como tambaqui (*Colossoma macropomum*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*), pirapitinga (*P. brachypomus*) e seus híbridos, também contribuíram de forma significativa, alcançando 163,7 mil toneladas, o que equivale a 26,5% da produção total (Valenti et al, 2021).

A produção aquícola brasileira é variada com diferentes tipos de sistemas. As fazendas em tanques-rede e outras instalações em águas abertas podem ser classificadas conforme o volume efetivo usado para criar os organismos ou de acordo com o volume de água disponível para diluir os resíduos. As fazendas em viveiros são classificadas em muito pequenas (< 2 ha), pequenas (2,1–4,9 ha), médias (5–49,9 ha) e grandes (> 50 ha). No Brasil cerca de 95% das fazendas baseadas em viveiros são muito pequenas, enquanto apenas 0,1% são grandes. As poucas fazendas grandes geralmente produzem camarão marinho, tambaqui/tambatinga ou tilápia (Valenti et al, 2021).

Segundo Barroso et al. (2019), a introdução de tilápias no Brasil remonta à década de 1950, quando *Oreochromis mossambicus* e *Tilapia rendalli* foram importadas da África para repovoamento de reservatórios hidrelétricos. Depois, mais espécies de tilápia, incluindo *O. angolensis*, *O. niloticus*, *O. aureus* e *O. urolepis hornorum*, foram introduzidas como espécies de repovoamento para melhorar a subsistência da comunidade pesqueira (especialmente pescadores de pequena escala). Com a ajuda do Centro de Pesquisa em Animais Aquáticos (CPAA) do Instituto Ambiental do Paraná e da Universidade Federal Rural de Pernambuco em Recife, a tilápia foi introduzida no estado do Paraná no final da década de 1970. O sucesso na criação da espécie levou a uma indústria de aquicultura de tilápia em expansão e ao estabelecimento da primeira planta de processamento de tilápia do Brasil, no estado do Paraná, no final da década de 1980. No entanto, em meados da década de 1990, a falta de matrizes juntamente com o manejo precário da produção de jovens e

alevinos de tilápia culminou em uma alta taxa de endogamia para a maioria dos estoques comerciais de tilápia no estado do Paraná (Zimmermann, 1999). Em 1996, uma linhagem *Oreochromis niloticus* do Asian Institute of Technology (AIT) em Bangkok, Tailândia, foi introduzida no Paraná (Zimmermann, 1999). A linhagem, conhecida como Chitralada, tinha várias características favoráveis (por exemplo, melhor domesticação, mais resistência ao frio e maior rendimento de filés) e, portanto, rapidamente se espalhou (Zimmermann, 2000). Desde o final da década de 1990, uma variedade de linhagens GIFT (*Genetically Improved Farmed Tilapia*), foram introduzidas no Brasil por empresas privadas e institutos de pesquisa, incluindo GIFT, GIFT Supreme, GIFT Spring e GIFT Aquamérica. Atualmente, as linhagens GIFT e Chitralada se tornaram as principais variedades de tilápia cultivadas no Brasil (Valenti et al, 2021).

O cultivo de tilápia é proibido na região amazônica brasileira, portanto, a maior parte da produção está concentrada nas regiões sul e sudeste do país, O Paraná é o estado com maior produção, seguido por São Paulo, Minas Gerais, Santa Catarina e Mato Grosso do Sul (IBGE, 2022). Os principais métodos de produção são os viveiros escavados e os tanques-rede flutuantes. Embora os viveiros escavados tenham sido tradicionalmente mais comuns no Brasil, o aumento dos custos de terras e a maior disponibilidade de reservatórios públicos impulsionaram um crescimento de mais de 30% na produção em tanques-rede entre 2014 e 2019. Embora ambos os métodos continuem em uso, os tanques-rede estão ganhando popularidade, pois evitam a necessidade de escavar viveiros em terrenos agrícolas caros, dispensam o enchimento de água dos viveiros e a água residual não precisa ser tratada na cultura em tanques-rede (Barroso et al., 2019). A popularidade crescente da tilápia do Nilo no Brasil, aliada à diversificação dos métodos de produção, aponta para um futuro promissor para o setor aquícola do país. Embora seja uma espécie tropical com produção ótima entre 26 e 28°C, a tilápia do Nilo agora também é cultivada em regiões subtropicais em todo o mundo, mas mostra um atraso no crescimento durante os meses mais frios do inverno (Samadda et al., 2024).

1.3 A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e o melhoramento genético no Brasil.

A linhagem Bouaké foi a primeira linhagem de tilápia do Nilo introduzida oficialmente por meio do DNOCS em 1971. Já a segunda linhagem “Chitralada” foi importada no ano de 1996, resultante de uma domesticação realizada no Japão e na Tailândia desde a década de 40 (Zimmermann, 1999). Posteriormente, a linhagem Genomar Supreme Tilapia (GST) foi introduzida pela empresa Genomar em 2002 (Cyrino et al., 2004), sendo seguida pela linhagem GIFT, originária da Malásia e introduzida em 2005 (Scorvo Filho et al., 2010). A GIFT foi desenvolvida pelo World Fish Center, a partir do cruzamento de oito linhagens, sendo quatro linhagens africanas selvagens e quatro linhagens domesticadas na Ásia (Massago et al., 2010).

Após a introdução das linhagens, alguns núcleos de melhoramento genético têm desenvolvido programas de seleção e tecnologias aplicadas à produção de tilápia do Nilo no Brasil, tanto em universidades como em empresas comerciais, onde a taxa de crescimento é a principal característica zootécnica de interesse para a seleção (Oliveira, 2016). Com isso, a linhagem GIFT tem mostrado que a aplicação de métodos atualizados de melhoramento genético resultou em uma resposta de seleção considerável para taxa de crescimento (entre 10% e 14% por geração), durante cinco gerações de seleção (Bentsen et al., 2017).

Apesar de ainda pouco explorados no Brasil, estudos têm avaliado outras características de interesse na produção da tilápia pelo mundo, como rendimento de filé (Rutten et al., 2005; Gjerde et al., 2012; Yoshida et al., 2019), tolerância ao frio (Charo-Karisa et al., 2005; Al et al., 2022), eficiência alimentar (De Verdal et al., 2018; Barría et al., 2021) e resistência a doenças (Lafrentz et al., 2016; Shoemaker et al., 2017; Wonmongkol et al., 2018; Sukhavachana et al., 2019). Entretanto, estudos voltados para o melhoramento genético de resistência a doenças é recente e está apenas começando no Brasil. Com isso, esforços se fazem necessários para a realização de estudos de melhoramento genético focados em resistência da tilápia a

infecções causadas por agentes patogênicos que têm ameaçado significativamente sua produção no Brasil, buscando-se alcançar uma aquicultura mais eficiente para os produtores.

1.4 Melhoramento genético para a resistência a doenças em tilápia do Nilo

Na aquicultura brasileira, estatísticas oficiais relacionadas às principais causas de perdas econômicas nos sistemas de produção são praticamente inexistentes. Contudo, consultas informais a produtores de tilápias em diversas regiões do Brasil têm registrado que surtos infecciosos causados por agentes patogênicos têm sido um dos maiores responsáveis por prejuízos econômicos na aquicultura (Kubitza et al., 2012).

Em uma produção de peixes em sistema intensivo, os produtores comumente utilizam altas densidades populacionais de peixes para compensar os custos de implementação e manutenção do sistema, buscando assim aumentar a produtividade das suas fazendas comerciais (Martins et al., 1998; Marcusso et al., 2017). Entretanto, com a intensificação da produção, o estresse é praticamente inevitável e a transferência de patógenos associada a uma alta densidade populacional predispõe os peixes a muitas doenças transmitidas por agentes patogênicos como bactérias, vírus, fungos e parasitas (Gjedrem, 2015).

Como alternativa imediata, o uso generalizado e irrestrito de antibióticos é adotado, o que pode resultar no surgimento de patógenos resistentes, na transferência da resistência para patógenos de animais terrestres, e em alterações da flora bacteriana dos sedimentos e coluna de água dos ambientes de aquicultura (Cabello, 2006). Por outro lado, experimentos de desafio baseados em testes de sobrevivência a patógenos específicos têm sido desenvolvidos para a realização de estudos que possuem o objetivo de investigar a existência de variação genética em

relação à variância genética (coeficientes de herdabilidade, h^2) para a resistência às infecções causadas por agentes patogênicos (Ødegard et al., 2011).

A herdabilidade é uma medida da força da relação entre os valores fenotípicos (desempenho observado) e os valores genéticos ou genotípicos (potencial genético) de uma característica em uma população. Esse conceito, comumente entendido como o grau em que os descendentes se assemelham aos pais em termos de desempenho para uma característica, é definido tecnicamente como o quadrado da correlação entre o fenótipo e o valor de cria. (Bourdon et al., 2000).

Quando a herdabilidade de uma característica é elevada, o desempenho dos indivíduos se torna um bom indicativo do seu valor de cria, uma vez que animais com melhor desempenho tendem a transmitir características favoráveis aos seus descendentes, resultando em um aumento no valor genético da prole. Por outro lado, quando a herdabilidade é baixa, o desempenho fenotípico é um preditor menos preciso do valor de cria, pois fatores ambientais têm uma influência mais significativa no desempenho, tornando a estimativa genética mais difícil.

A importância da herdabilidade reside em sua aplicação na melhoria genética: quanto mais herdável for uma característica, mais eficaz será selecionar animais com melhores desempenhos para melhorar essa característica na descendência. Assim, características altamente herdáveis permitem uma seleção mais precisa e resultados mais previsíveis nos programas de melhoramento. (Bourdon et al., 2000). No caso da tilápia do Nilo, estudos recentes buscaram avaliar os parâmetros genéticos de resistência considerando importantes agentes patogênicos que têm acometido seriamente os estoques. Por exemplo, para a resistência contra as bactérias *Streptococcus iniae* e *S. agalactiae*, baixos a moderados valores de herdabilidade têm sido encontrados (variando entre 0.11 e 0.58) (Lafrentz et al., 2016; Shoemaker et al., 2017; Suebsong et al., 2019). Outro estudo também estimou valores moderados de herdabilidade para resistência à bactéria *Flavobacterium columnare*, com valores de $h^2 = 0,30$ para taxa de sobrevivência e $h^2 = 0,17$ para tempo de morte, revelando a

possibilidade de se obter peixes geneticamente resistentes a *F. columnare*, através da seleção genética (Wonmongkol et al., 2018).

1.5 *Francisella orientalis*.

A *Francisella orientalis* (FO) é uma bactéria patogênica intracelular facultativa e fastidiosa, responsável pela franciselose piscícola, uma doença emergente que tem sido relatada globalmente, afetando várias espécies de peixes de cultivo e peixes selvagens em ecossistemas marinhos e de água doce (Colquhoun, 2011). Em tilápias, segundo Soto et al. (2009), a mortalidade pode variar de 5% a 90%, dependendo das condições da fazenda. Apenas 23 unidades formadoras de colônias (UFC) podem ser letais para os alevinos de tilápia (Soto et al., 2009).

Além da tilápia, várias outras espécies de peixes de importância econômica entre elas Bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*), Salmão do Atlântico, (*Salmo salar* o robalo híbrido, (*Morone chrysops* × *M. saxatilis*) foram documentados como afetadas pela franciselose. Pode ser transmitida horizontalmente através diferentes vias de infecção, como injeção, imersão, coabitação de peixes infectados com peixes saudáveis ou contato direto com água contaminada (Soto et al., 2013), e verticalmente de reprodutores subclínicamente infectados para sua progênie (Nguyen et al., 2019). A franciselose acomete principalmente a tilápia do Nilo durante o período em que ocorrem quedas na temperatura da água (Ottem et al. 2007; Soto et al. 2009), sendo que no Brasil ocorre principalmente durante o inverno, e principalmente nas regiões Sul e Sudeste (Jatobá et al., 2016).

As lesões mais comumente encontradas são esplenomegalia, nefromegalia, com granulomas multifocais afetando principalmente o baço, fígado, rins, intestinos e músculo esquelético (Jeffery et al., 2010; Colquhoun e Duodu, 2011; Camus et al., 2013). Tais lesões têm sido caracterizadas pela alta quantidade de cocobastonetes

que se acumulam nos citoplasmas celulares ocasionando vasculite necrotizante focal e difusa, resultando na formação dos granulomas (Maurel et al., 2007; Soto et al., 2012). Durante a necropsia também é possível observar áreas hemorrágicas focais, perda de escamas, e erosões na epiderme (Soto et al., 2009; Martins et al., 2015). A natureza crônica da franciselose causa perdas econômicas devido ao crescimento lento e à conversão alimentar deficiente (Shoemaker et al., 2022).

A taxonomia da francisella tem sido complexa devido à sua natureza exigente, os isolados de *F. noatunensis* subsp. *noatunensis* e *F. noatunensis* subsp. *orientalis* não reagem aos testes bioquímicos padrão comumente usados na microbiologia, o que dificulta a avaliação comparativa de suas respostas fisiológicas a diferentes metabólitos em estudos taxonômicos (Ottem et al., 2009). Ramirez-Paredes et al. (2017) descreveram uma abordagem prática e econômica para a caracterização de *F. noatunensis* subsp. *orientalis*, baseada em parâmetros genômicos, fenotípicos e quimiotaxonômicos, sugerindo um possível erro na classificação taxonômica dessa subespécie dentro da espécie *F. noatunensis*.

Na última década, houve um aumento no número de espécies e gêneros descritos de maneira eficaz dentro da família Francisellaceae (Ramirez-Paredes et al., 2020). Embora esses estudos tenham contribuído para uma melhor compreensão da estrutura populacional da família, a falta de critérios claros para a delimitação de táxons relacionados resultou em controvérsias taxonômicas.

Com base nos estudos de Ramirez-Paredes et al. (2020), foi proposta a elevação de *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* ao nível de espécie como *F. orientalis*, apoiada por análises genômicas e filogenéticas que mostram uma divergência genética significativa entre *F. orientalis* e outras subespécies de *F. noatunensis*. As diferenças são grandes o suficiente para justificar a criação de uma nova espécie.

Diversas medidas preventivas têm sido investigadas para o controle da franciselose, incluindo a suplementação dietética com ácido ascórbico para fortalecer

a imunidade e reduzir a genotoxicidade nos peixes (El-Garawani et al., 2021) e diversos métodos de imunização (Pulpipat et al., 2020; Ramírez-Paredes et al., 2017), que mostraram resultados promissores. No entanto, a medida mais comumente utilizada para o controle da doença é a terapia antibiótica oral, onde os medicamentos são incorporados à ração (Soto et al., 2010, 2013).

No estudo de Oliveira et al. (2022), foi relatado que o uso de enrofloxacin em uma dosagem de 10 mg/kg de peso vivo pode reduzir o risco relativo de morte por infecção por *F. orientalis* em 92%. Contudo, o uso de fluoroquinolonas em aquicultura não é aprovado (Wallinga et al., 2022), limitando sua aplicabilidade em sistemas produtivos. Como alternativa, testaram o uso de oxitetraciclina, um antibiótico aprovado para aquicultura globalmente, que demonstrou reduzir a mortalidade de peixes infectados. No entanto, o tratamento permite que os peixes sobreviventes se tornem portadores do patógeno, possibilitando que *F. orientalis* permaneça na população.

A vacinação é uma opção preventiva contra a franciselose em tilápia. A primeira vacina documentada contra essa doença foi desenvolvida por Soto et al. (2011), utilizando uma vacina viva atenuada administrada por imersão. Embora tenha oferecido algum nível de proteção, sua eficácia foi baixa a moderada, com uma taxa relativa de sobrevivência entre 23,75 % e 45,74 %, dependendo do tempo de exposição (30 ou 180 minutos). Além disso, a proteção foi de curta duração, indicando que essa estratégia não era viável devido ao risco de os patógenos retornarem ao estado virulento.

Pulpipat et al. (2020) avaliaram uma vacina intraperitoneal, que apresentou resultados mais promissores. Essa vacina gerou um título de anticorpos elevado nos peixes, alcançando uma taxa de sobrevivência de 71 % após o desafio. Embora as vacinas representem uma importante ferramenta preventiva, as vacinas autógenas apresentam várias limitações que reduzem sua eficácia no controle de (FO) em populações de tilápia. Por serem desenvolvidas a partir de cepas específicas de uma única população afetada, essas vacinas geralmente são direcionadas para um único

sorotipo, o que limita sua capacidade de induzir imunidade protetora contra outras variantes do patógeno. Isso pode favorecer o surgimento de novos surtos devido à circulação de cepas não cobertas pela vacina. Outro fator limitante é a idade e o peso ideais para a vacinação, que exigem que os peixes sejam imunizados em idade precoce, o que dificulta a manipulação e compromete a eficácia do processo de vacinação. Além disso, vacinar uma população completa de tilápias requer um investimento significativo, tanto na produção da vacina, que tende a ser cara, quanto na contratação de mão de obra especializada para sua administração, o que pode aumentar os custos operacionais da piscicultura.

1.6 Melhoramento genético para *francisella orientalis*.

Os estudos investigativos a respeito dos parâmetros genéticos relacionados com a resistência da tilápia à *F.orientalis* são recentes, e têm sido realizados em países de expressão na aquicultura (Shoemaker et al., 2022) e em estoques pertencentes a empresas multinacionais da região sul do Brasil (Joshi et al., 2021). Shoemaker et al. (2022) destacaram o potencial da seleção genética como uma estratégia viável para melhorar a resistência da tilápia a FO em programas de reprodução. Os estudos realizados por Soto et al.,(2021) e Joshi et al.,(2021) têm demonstrado valores moderados a altos de herdabilidade para sobrevivência à infecção (0.31 ± 0.05 e 0.37 ± 0.05 , respectivamente).

Shoemaker et al. (2022) destacaram o potencial da seleção genética como uma estratégia viável para melhorar a resistência da tilápia a FO em programas de reprodução. Eles encontraram uma herdabilidade (h^2) de $0,36 \pm 0,11$ para a resistência à bactéria, em concordância com os resultados de Joshi et al. (2021). Esses valores indicam um componente genético aditivo significativo, o que reforça a viabilidade de aprimorar a resistência da tilápia a esse patógeno através da seleção genética.

Apesar dos dois estudos já realizados, a necessidade de mais informações a respeito dos parâmetros genéticos aditivos de resistência da tilápia à FO é evidente e necessitam ser realizados, particularmente no que diz respeito à resistência a cepas com ocorrência específica em pisciculturas brasileiras. Portanto, uma maior realização de pesquisas abrangendo os estoques de tilápia brasileiros pode favorecer a tomada de decisões para controlar e prevenir a disseminação da bactéria em seus sistemas de cultivo. Assim, a busca por medidas preventivas que aperfeiçoem a produção e, ao mesmo tempo, garantam a sanidade do plantel de peixes, promovem uma produção sustentável e podem viabilizar um produto com maior qualidade para o consumidor.

1.7 Ganho genético.

O ganho genético refere-se ao aumento da média de uma característica desejada em uma população, resultante da seleção de indivíduos com superioridade genética com base em características de interesse. Esse conceito é essencial em programas de melhoramento genético, e sua eficácia depende de fatores como a intensidade de seleção, a herdabilidade da característica, a variação fenotípica e o intervalo geracional (Falconer & Mackay, 1996; Gjedrem et al., 2012). Na aquicultura, o ganho genético tem se mostrado significativamente maior em comparação com outras espécies de produção, devido aos ciclos reprodutivos mais curtos e à alta variabilidade genética presente nas populações de espécies aquáticas (Gjedrem & Thodesen, 2005).

A característica mais comumente explorada na aquicultura é o crescimento, por sua importância econômica e pela facilidade de medição nos animais vivos. Gjedrem e Thodesen (2005) relataram um ganho genético médio de 12,7% por geração no peso corporal para várias espécies aquáticas, com estimativas variando entre 2,3% e 42% por geração. Por exemplo, o salmão do Atlântico (*Salmo salar*) apresentou um ganho genético médio de 17,8% por geração, enquanto a tilápia e o camarão *Litopenaeus*

vannamei também mostraram aumentos significativos na taxa de crescimento em programas de seleção (Bentsen et al., 2003; Thodesen et al., 1999). Esse elevado nível de ganho genético permite dobrar a taxa de crescimento em apenas seis gerações de seleção, o que é um feito notável em espécies como a tilápia e o salmão Atlântico (Thodesen et al., 1999).

As características de resistência a doenças têm grande relevância econômica na aquicultura, devido ao impacto dessas doenças nas taxas de sobrevivência e nos custos produtivos. Diversos estudos já observaram ganhos genéticos em várias espécies. Em salmão, por exemplo, foi relatado um ganho genético de aproximadamente 11% por geração na resistência à necrose pancreática infecciosa (IPN) (Storset et al., 2007). Em camarões, a seleção genética resultou em um ganho de até 19% na resistência ao Vírus da Síndrome de Taura (TSV) (Argue et al., 2002).

No caso da tilápia, a resistência a patógenos também mostra progresso considerável. Shoemaker et al. (2016) relataram um ganho genético de 8,5% por geração na resistência ao *Streptococcus iniae*, enquanto Mendoza et al. (2013) indicaram ganhos de 6% a 10% por geração na resistência à *Aeromonas hydrophila*. Esses resultados refletem o potencial da seleção genética como ferramenta para o aumento da resiliência das espécies aquícolas contra doenças, promovendo maior sustentabilidade na produção. Para *F. orientalis* não existem trabalhos avaliando o ganho genético realizado após a seleção.

1.8 Referências

Argue, B. J., Arce, S. M., Lotz, J. M., & Moss, S. M. (2002). Selective breeding of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) for growth and resistance to Taura Syndrome Virus. *Aquaculture*, 204(3-4), 447-460.

Ariede, R. B., Lemos, C. G., Batista, F. M., Oliveira, R. R., Agudelo, J. F., Borges, C. H., ... & Hashimoto, D. T. (2023). Computer vision system using deep learning to predict rib and loin yield in the fish *collossoma macropomum*. *Animal Genetics*, 54(3), 375-388.

Barría, A., Trinh, T. Q., Mahmuddin, M., Benzie, J. A., Chadag, V. M., & Houston, R. D. (2020). Genetic parameters for resistance to Tilapia Lake Virus (TiLV) in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 522, 735126.

Barroso, R. M., Muñoz, A. E. P., & Cai, J. (2019). Social and economic performance of tilapia farming in Brazil. *FAO*.

Bentsen, H. B., Gjerde, B., Eknath, A. E., de Vera, M. S. P., Velasco, R. R., Danting, J. C., ... & Ponzoni, R. W. (2017). Genetic improvement of farmed tilapias: Response to five generations of selection for increased body weight at harvest in *Oreochromis niloticus* and the further impact of the project. *Aquaculture*, 468, 206-217.

Birkbeck, T. H., Feist, S. W., & Verner–Jeffreys, D. W. (2011). *Francisella* infections in fish and shellfish. *Journal of fish diseases*, 34(3), 173-187.

Boler, D. D., Woerner, D. R. (2017). What is meat? A perspective from the American Meat Science Association. *Animal Frontiers*, 7.

Carneiro, F. C. P. G. (2023). Contributions of alternative agricultures to food security, profitability and sustainability: a narrative review.

Colquhoun, D. J., & Duodu, S. (2011). *Francisella* infections in farmed and wild aquatic organisms. *Veterinary Research*, 42, 47–62.

Cyrino, J. E. P., Urbinati, E. C., Fracalossi, D. M., & Castagnolli, N. (2004). Special topics in tropical freshwater fish farming intensive. TecArt Editora.

Edwards, P., Zhang, W., Belton, B., & Little, D. C. (2019). Misunderstandings, myths, and mantras in aquaculture: Its contribution to world food supplies has been systematically over reported. *Maine Policy*, 106.

El-Garawani, I. M., Khallaf, E. A., Alne-Na-Ei, A. A., Elgendy, R. G., Mersal, G. A., & El-Seedi, H. (2021). The role of ascorbic acid combined exposure on Imidacloprid-induced oxidative stress and genotoxicity in Nile tilapia. *Scientific reports*, 11.

El-Sayed, A.-F.M. (2019). *Tilapia Culture*. Amsterdam, Netherlands: Elsevier Science & Technology.

El-Sayed, A.-F.M. (2019). *Tilapia farming: second edition*. Academic Press, San Diego, USA, 358 pp.

FAO. (2020). *Fisheries and aquaculture statistics. Global aquaculture and fisheries production 1950–2018 (Fishstat)*. Rome: FAO Fisheries and Aquaculture Department.

FAO. (2020). *The state of world fisheries and aquaculture*. Rome: FAO. <http://www.fao.org/documents/card/en/c/ca9229en>.

FAO. (2022). *FishStatJ: software universal para series temporales de estadísticas pesqueras: producción acuícola 1950-2020*. FAO, Roma.

FAO. (2024). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2024*. FAO. <https://www.fao.org/publications/sofia/2024/>

Falconer, D. S., & Mackay, T. F. C. (1996). *Introduction to Quantitative Genetics* (4th ed.). Longman.

Freitas, M. V., Lira, L. V., Ariede, R. B., Agudelo, J. F., de Oliveira Neto, R. R., Borges, C. H., ... & Hashimoto, D. T. (2021). Genotype by environment interaction and

genetic parameters for growth traits in the Neotropical fish pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Aquaculture*, 530, 735933.

Gjedrem, T. (2015). Disease resistant fish and shellfish are within reach: a review. *Journal of Marine Science and Engineering*, 3(1), 146-153.

Gjedrem, T., & Rye, M. (2015). Selection response in fish and shellfish: a review. *Rev. Aquac.*, 10, 168–179.

Gjedrem, T., Robinson, N., & Rye, M. (2012). The importance of selective breeding in aquaculture to meet future demands for animal protein: A review. *Aquaculture*, 350-353, 117-129.

Gjedrem, T., & Thodesen, J. (2005). Selection and breeding programs in aquaculture. Springer Netherlands, 89-111.

Gjøen, H. M., & Bentsen, H. B. (1997). Past, present, and future of genetic improvement in salmon aquaculture. *ICES Journal of Marine Science*, 54(6), 1009-1014.

Gjerde, B., Mengistu, S. B., Ødegård, J., Johansen, H., & Altamirano, D. S. (2012). Quantitative genetics of body weight, fillet weight and fillet yield in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 342, 117-124.

Houston, R. D., Bean, T. P., Macqueen, D. J., Gundappa, M. K., Jin, Y. H., Jenkins, T. L., ... & Robledo, D. (2020). Harnessing genomics to fast-track genetic improvement in aquaculture. *Nature Reviews Genetics*, 21(7), 389-409.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. (2021). Produção Pecuária Municipal (2021). Disponível em: https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2021_v49_br_informativo.pdf

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. (2022). Produção Pecuária Municipal (2022).

Jatobá, A., Klipp, S. P., & Hoppe, R. (2016). Primeiro relato de *Francisella noatunensis* subespécie *orientalis* no sul do Brasil – relato de caso. *Acta Veterinaria Brasilica*, 10(2), 172-176.

Jory, D. E., Alceste, C., & Cabrera, T. R. (2000). Mercado y comercialización de tilapia en los Estados Unidos de Norte América. *Panorama Acuícola*, 5(5), 50-53.

Joshi, R., Skaarud, A., de Vera, M., Alvarez, A. T., & Ødegård, J. (2020). Genomic prediction for commercial traits using univariate and multivariate approaches in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 516, 734641.

Joshi, R., Almeida, D. B., da Costa, A. R., Skaarud, A., Pereira, U. P., Knutsen, T. M., & Alvarez, A. T. (2021). Genomic selection for resistance to Francisellosis in commercial Nile tilapia population: genetic and genomic parameters, correlation with growth rate and predictive ability.

Kause, A., Marjanovic, J., & Gjerde, B. (2021). Genetic correlations between feed efficiency, growth, and survival in Atlantic salmon (*Salmo salar*) under different feeding regimes. *Aquaculture*, 534, 736293.

Leal, C. A. G., Tavares, G. C., & Figueiredo, H. C. P. (2014). Outbreaks and genetic diversity of *Francisella noatunensis* subsp *orientalis* isolated from farm-raised Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Brazil. *Genetics and Molecular Research*, 13(3), 5704-5712.

Marccusso, P. F., Salvador, R., & De Almeida Marinho-Neto, F. (2017). Infecção por *Streptococcus agalactiae* em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Revista de Ciências Agroveterinárias*, 16(2), 165-169.

Martins, M. L. (1998). *Doenças infecciosas e parasitárias de peixes* (2nd ed.). Jaboticabal: FUNEP, 66p.

Massago, Haluko et al. (2010). Crescimento de quatro linhagens de tilápia *Oreochromis niloticus*. *Revista Acadêmica Ciência Animal*, 8(4), 397-403.

Negrón-Mendoza, D., Palma, R., Martínez, C., & Sanchez, F. (2013). Genetic resistance to *Aeromonas hydrophila* in Nile tilapia. *Aquaculture Research*, 45(2), 134-141.

Nguyen, V. V., Dong, H. T., Senapin, S., Gangnonngiw, W., Pirarat, N., Kayansamruaj, P., ... & Rodkhum, C. (2019). Transmission of *Francisella noatuensis* subsp. *orientalis* from subclinically infected hybrid red tilapia broodstock (*Oreochromis* sp.) to their offspring. *Microbial pathogenesis*, 136, 103670.

Ottem, K. F., Nylund, A., Karlsbakk, E., Friis-Møller, A., & Kamaishi, T. (2009). Elevation of *Francisella philomiragia* subsp. *noatunensis*. *Journal of Applied Microbiology*, 106(4).

Ramirez-Paredes, J. G., Larsson, P., Thompson, K. D., Penman, D. J., Busse, H. J., Öhrman, C., ... & Colquhoun, D. J. (2020). Reclassification of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* Ottem et al. 2009 as *Francisella orientalis* sp. nov., *Francisella noatunensis* subsp. *chilensis* subsp. nov. and emended description of *Francisella noatunensis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(3), 2034-2048.

Ramirez-Paredes, J. G., Larsson, P., Wehner, S., Bekaert, M., Öhrman, C., Metselaar, M., ... & Adams, A. (2017). Draft genome sequence of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* STIR-GUS-F2f7, a highly virulent strain recovered from diseased Red Nile Tilapia farmed in Europe. *Genome Announcements*, 5(11), 10-1128.

Robledo, D., Palaiokostas, C., Bargelloni, L., Martínez, P., & Houston, R. (2018). Applications of genotyping by sequencing in aquaculture breeding and genetics. *Reviews in aquaculture*, 10(3), 670-682.

Rutten, M. J., Bovenhuis, H., & Komen, H. (2005). Genetic parameters for fillet traits and body measurements in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). *Aquaculture*, 246(1-4), 125-132.

Rutten, M. J., Komen, H., & Bovenhuis, H. (2005). Longitudinal genetic analysis of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) body weight using a random regression model. *Aquaculture*, 246(1-4), 101-113.

Tsai, H. Y., Hamilton, A., Tinch, A. E., Guy, D. R., Bron, J. E., Taggart, J. B., ... & Houston, R. D. (2016). Genomic prediction of host resistance to sea lice in farmed Atlantic salmon populations. *Genetics Selection Evolution*, 48, 1-11.

Schulter, E. P., & Vieira Filho, J. E. R. (2017). Evolução da piscicultura no Brasil: Diagnóstico e desenvolvimento da cadeia produtiva de tilápia. *Texto para Discussão*.

Shoemaker, C. A., Lozano, C. A., Abernathy, J. W., & Beecham, R. V. (2016). Genetic improvement of resistance to *Streptococcus iniae* in hybrid tilapia. *Aquaculture*, 464, 479-484.

Shoemaker, C. A., Lozano, C. A., LaFrentz, B. R., Mumma, P., Vela-Avitúa, S., Ospina-Arango, J. F., ... & Rye, M. (2022). Additive genetic variation in resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to *Francisella orientalis* and its genetic (co) variation to both harvest weight and resistance to *Streptococcus agalactiae* lb. *Aquaculture*, 561, 738736.

Silva, G. F., Shiotsuki, L., Dias, L. T., & Teixeira, R. A. (2023). Estimation of genetic parameters for weight and length gains in tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Brazilian Journal of Biology*, 83, e277423.

Soto, E., Kidd, S., Gaunt, P. S., & Endris, R. (2013). Efficacy of florfenicol for control of mortality associated with *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Journal of fish diseases*, 36(4), 411-418.

Soto, E., Abrams, S. B., & Revan, F. (2012). Effects of temperature and salt concentration on *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* infections in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Diseases of aquatic organisms*, 101(3), 217-223.

Soto, E., Wiles, J., Elzer, P., Macaluso, K., & Hawke, J. P. (2011). Attenuated *Francisella asiatica* igIC mutant induces protective immunity to francisellosis in tilapia. *Vaccine*, 29(3), 593-598.

Soto, E., Endris, R. G., & Hawke, J. P. (2010). In vitro and in vivo efficacy of florfenicol for treatment of *Francisella asiatica* infection in tilapia. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(11), 4664-4670.

Soto, E., Fernandez, D., & Hawke, J. P. (2009). Attenuation of the fish pathogen *Francisella* sp. by mutation of the igIC* gene. *Journal of Aquatic Animal Health*, 21(3), 140-149.

Soto, E., Shahin, K., Talhami, J. J., Griffin, M. J., Adams, A., & Ramírez-Paredes, J. G. (2019). Characterization of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* isolated from Nile tilapia *Oreochromis niloticus* farmed in Lake Yojoa, Honduras. *Diseases of Aquatic Organisms*, 133(2), 141-145.

Tacon, A. G., & Metian, M. (2015). Feed matters: satisfying the feed demand of aquaculture. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 23(1), 1-10.

Thodesen, J., Grisdale-Helland, B., Helland, S. J., & Gjerde, B. (1999). Feed intake, growth and feed utilization of offspring from wild and selected Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 180(3-4), 237-246.

Valenti, W. C., Barros, H. P., Moraes-Valenti, P., Bueno, G. W., & Cavalli, R. O. (2021). Aquaculture in Brazil: past, present and future. *Aquaculture Reports*, 19, 100611.

Yáñez, J. M., Bangera, R., Lhorente, J. P., Barría, A., Oyarzún, M., Neira, R., & Newman, S. (2016). Negative genetic correlation between resistance against *Piscirickettsia salmonis* and harvest weight in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquaculture*, 459, 8-13.

Yáñez, J. M., Newman, S., & Houston, R. D. (2015). Genomics in aquaculture to better understand species biology and accelerate genetic progress. *Frontiers in genetics*, 6, 128.

Wallinga, D., Smit, L. A., Davis, M. F., Casey, J. A., & Nachman, K. E. (2022). A review of the effectiveness of current US policies on antimicrobial use in meat and poultry production. *Current environmental health reports*, 9(2), 339-354.

Zimmermann, S. (1999). Incubação artificial: técnica permite a produção de tilápias do Nilo geneticamente superiores. *Panorama da Aqüicultura*, 9(54), 15-21.

Zimmermann, S. (2000). O bom desempenho das Chitraladas no Brasil. *Panorama da Aquicultura*, julho/agosto: 15–17.

2 Objetivos.

2.1 Objetivo Geral:

- Avaliar a resistência genética de populações de tilápia *Oreochromis niloticus* provenientes de pisciculturas do estado de São Paulo contra a bactéria FO, por meio de análise genético-quantitativa.

2.2 Objetivos Específicos:

- Realizar um experimento de desafio de resistência contra a FO utilizando famílias de meio irmãos e irmãos completos de juvenis de tilápia, para avaliar a variação fenotípica de resistência a esta bactéria por meio de taxa de sobrevivência e tempo de morte;
- Avaliar parâmetros de genética quantitativa das famílias de tilápia em relação à resistência à FO, por meio de estimativas dos componentes de variância, herdabilidade, ganho genético.

**Genetic selection for resistance to
Francisella orientalis shows significant
selection response in Nile tilapia**

Genetic selection for resistance to *Francisella orientalis* shows significant selection response in Nile tilapia

Jairo A. Restrepo-Arango^{*a}, Baltasar F. Garcia^{*a}, Marcelo S. S. Filho^a, Elielma L. Sousa^a, John F. G. Agudelo^a, Vito A. Mastrochirico-Filho^a, Carolina S. Pereira^a, Danielle C. Dias^b, Antonio F. Leonardo^b, Leonardo Tachibana^b, Maria J. T. Ranzani-Paiva^b, Fabiana Pilarski^a, Diogo T. Hashimoto^{a+}

^aSão Paulo State University (Unesp), Aquaculture Center of UNESP, 14884-900 Jaboticabal, SP, Brazil

^bAquaculture Research Center, Scientific Research of Fisheries Institute/APTA/SAA, 05001-900, São Paulo, SP, Brazil

*These authors contributed equally to this study

+Corresponding author. Tel.: +55 16 3209-7477, r. 7721

Email address: diogo.hashimoto@unesp.br

**Artigo submetido à revista
Manuscript Number: AQUACULTURE-D-24-05196.**

1. Abstract

Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) is one of the major aquaculture species, but its production is often challenged by emerging diseases, as francisellosis caused by *Francisella orientalis*. Selective breeding for disease resistance offers a sustainable alternative to prevent outbreaks in farming facilities. This study aimed to estimate the genetic parameters and evaluate the response to selection for resistance to *F. orientalis* in Nile tilapia. We conducted two sequential challenge tests across two generations (G0 and G1) to assess the heritability (h^2) of resistance traits using pedigree information, including binary survival (BS) and time to death (TD). Additionally, six families in G1 were designated as controls, consisting of breeders with the lowest estimated breeding values (EBV). The realized response to selection (ΔG_R) was estimated using the BS trait. The expected response to selection (ΔG_E) was also estimated using the genetic parameters of the TD trait in the second challenge. Average TD results were lower in G1 than G0, 56.59 ± 17.27 and 73.70 ± 27.68 hours, respectively. The h^2 estimates for G0, G1 and G0+G1 were 0.399 ± 0.07 , 0.282 ± 0.08 and 0.593 ± 0.07 for TD, and 0.470 ± 0.08 , 0.295 ± 0.08 and 0.517 ± 0.06 for BS. The ΔG_R at the family level were -0.144 for G1 control, -0.0638 for G0, and 0.0122 for G1 resistance, indicating a positive effect of selection for resistance. The ΔG_E showed potential genetic gains of 33 to 109 hours in TD for the next generation depending on the selection intensity. The study found that resistance to *F. orientalis* in Nile tilapia has a significant additive genetic component and selective breeding can effectively improve disease resistance, with the potential for rapid genetic gains across generations.

Key-words: *Francisella orientalis* resistance, Breeding programs, Heritability, Genetic gains, Nile tilapia aquaculture

2. Introduction

Nile tilapia is one of the most produced aquaculture species in inland waters, achieving 4.915 million of tons in 2022 (FAO, 2024). In the same year, this species was produced in 83 countries represented mainly in Asia by China (26.2% of world production) and Indonesia (25.4%), in Africa by Egypt (16.2%) and Ghana (2%) and in the Americas by Brazil (8.3%) and Honduras (0.8%) (FAO, 2024). As in other aquaculture species, a major issue in the expansion of tilapia production is the occurrence of diseases during different growing phases (Nguyen, 2024)..

In Brazil, one of the main emerging diseases that affect the tilapia production is caused by the bacterium *Francisella orientalis*, which affects mainly fingerlings and juveniles during the winter (Leal et al., 2014). *F. orientalis* is a Gram-negative intracellular bacterium that causes the piscine francicellosis, a disease with nonspecific clinical signs, such as loss of appetite, lethargy, ascites, and whiteness on the surface body (Birkbeck et al., 2011; Soto et al., 2019). The main characteristic of francicellosis is the occurrence of granulomas in different internal organs, such as spleen, liver and intestine (Soto et al., 2009).

Control measures for francicellosis currently employed are based on the utilization of antibiotics, for example: tetracycline, oxytetracycline and florfenicol (Bohle et al., 2009; Ostland et al., 2006; Soto et al., 2013). However, the high prevalence and transmissibility allied to lethargy and low ingestion of feed (antibiotics are usually administered through feed) have not produced long-term results in most of cases (Colquhoun and Duodu, 2011). Whole-cell inactivated autogenous vaccines are available for this disease (Oliveira et al., 2022; Pulpipat et al., 2020; Ramírez-Paredes

et al., 2019), but most of them are experimental. The autogenous vaccines available are injectable being difficult to be executed as *F. orientalis* affects mostly small animals resulting in a laborious and expensive task. For this reason, increasing the natural resistance of animals facing the pathogen is a more viable and sustainable option. The main strategy to improve the resistance is selecting animals that exhibit this trait to be parents of the next generations through breeding programs (Yáñez et al., 2015).

Breeding programs for aquaculture species expanded in the last years contemplating a number of economic relevant traits such as growth, disease resistance, meat quality and reproduction (Yáñez et al., 2022). One of the key aspects of implementing breeding programs is determining whether there is enough additive genetic variance to allow the selection of animals, indicating that the trait can respond to selection (Gjedrem, 2005). To improve disease resistance, it is possible to challenge part of animals to the pathogen in order to produce a resistance phenotype (usually time to death or survival status) (Ødegård et al., 2011). Using genealogy (pedigree) and/or genomic information, we can estimate the trait's heritability, i.e., the proportion of phenotypic variance explained by the genetic additive variance (Falconer and Mackay, 1996). If this value is significant, we can estimate breeding values (EBVs) of the selection candidates (siblings of challenged animals) and mate more resistant animals to be parents of the next generations.

Resistance to francisellosis in Nile tilapia already showed moderate heritability values ranging from 0.27 ± 0.02 to 0.40 ± 0.12 using pedigree and genomic information, respectively (Joshi et al., 2021; Shoemaker et al., 2022). However, the realized genetic gain was not assessed for this trait in Nile tilapia, and the true potential of selecting

animals genetically more resistant to *F. orientalis* is unknown. We estimated the genetic parameters and evaluated the genetic gain for *F. orientalis* resistance in Nile tilapia after one cycle of selection by challenging two sequential generations.

3. Material and methods

3.1 Ethic statement

This study was conducted in strict accordance with the recommendations of the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) (Brazilian Ministry for Science, Technology and Innovation) and was approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA number 19.005/17) of School of Agricultural and Veterinary Sciences, UNESP, Campus Jaboticabal, SP, Brazil..

3.2 Origin of animals, reproduction and production of G0

A total of 66 families were produced in the base generation (G0). These families were formed using males and females from three different origins (Sao Paulo State – Brazil): two commercial fish farms (29 families from Farm1 and 8 from Farm2) and 29 families from the experimental facilities of the Fisheries Institute (IP-APTA – São José do Rio Preto, Sao Paulo State – Brazil). A summary of G0 families is available in (Table 1).

Table 1. Population structure of generations 0 and 1 (G0 and G1) used in the sequential *Francisella orientalis* challenges for Nile tilapia.

Generation	Sires	Dams	Families	Full-Sibs	Half-Sibs
G0	29 (37)*	66	66	48	18
G1	66	101	112	74	38

* 29 sires are known and 37 are unknown.

The reproduction in the fish farms was performed in breeding tanks (4 x 2 x 1.5 m) to maintain the broodstock in a ratio of approximately 40:20 (females:males). Eggs were collected from the oral cavity of females during the incubation period. Collections were performed in each tank only a single time. Although the sire of each family was unknown, the procedure of collecting only once per tank provides reliability that the same sire did not fertilize different spawns, since it is unlikely that a male would be able to fertilize several spawns at the same time in a single reproductive cycle. However, there is the possibility of multiple males fertilizing the same spawn from a single female (Fessehaye et al., 2006); therefore, genetic analyses were performed considering these families as full-siblings or half-siblings (unknown sire). The collected eggs were transported in plastic bags with oxygen, separated by family (female), and sent to the Aquaculture Genetics and Conservation Laboratory of the Aquaculture Center of Unesp (Caunesp), Jaboticabal, Sao Paulo.

The other 29 families produced in the IP were produced using the protocols developed for GIFT (genetically improved farmed tilapia) by WorldFish (WorldFish Center, 2004) with some adaptations. The broodstock were initially separated by sex in storage pens (3 x 2 x 1.5 m) for a period of two weeks to facilitate the assessment of the sexual maturity status of the females. Furthermore, females were separated from males prior reproduction to synchronize spawning and produce groups of progenies that are uniform in size and age, which reduced the confounding effects in the estimation of genetic parameters.

After the synchronizing period, the females were analyzed for spawning status by visual analysis of their morphological characteristics. The females “ready-to-spawn”, with the characteristics of red and prominent genital papilla, fully open genital pore and distended abdomen, were first selected for mating attempts in the breeding hapas (2 x 1 x 1 m). The males were selected by abdominal pressure to evaluate sperm release and then allocated in the breeding hapas. A 2:1 ratio (female:male) was used to form the matings. The breeding hapas were evaluated weekly, collecting the eggs from the oral cavity of females. Eggs from the Institute of fisheries were incubated in the same facility.

All eggs (from commercial fish farms and The Fisheries Institute) were placed similarly in incubators at both locations with similar characteristics: capacity of 3L and maintained in water recirculation systems. After hatching in the incubators, the larvae migrated through the continuous water flow to nurseries exclusive to each family, with a capacity of approximately 10L, where they remained for approximately 40 days. After absorption of the yolk sac, the larvae were fed with mashed feed in diets containing 32% crude protein.

Then, approximately 200 fries from each of the commercial fish farm families were transferred to fiberglass tanks (capacity of approximately 350 liters) and kept in a water recirculation system at Caunesp. Similarly, the fries from The Fisheries Institute were transferred to hapas (1 x 1 x 1 m) and kept in a 300 m² excavated pond. In the frying and rearing stage, 1.2 mm feed (40% crude protein) was used and fed twice a day (Nutripiscis Presence - ADM®). At approximately 4 months of age, the families formed at the Fisheries Institute were transported to Caunesp. Then, the entire

experimental population (approximately 3,000 animals) was identified using pit-tags (FDX-B) by intraperitoneal inoculation when the smallest animal reached a minimum of 5.0 g (SD = 1.0 g), to maintain pedigree information throughout the experiments. Fish that presented morphological abnormalities were excluded from the experiments. Finally, each family was divided in two groups: challenge and candidates.

3.3 First challenge with *F. orientalis*

Before challenge, the lethal dose of 75% of individuals (LD_{75}) was defined. After previous experiences in other bacterial experiments of our research group (Oliveira-Neto et al., 2024), we adopted the LD_{75} instead of the LD_{50} to recover the maximum amount of data for the time to death trait. In general, the time to death is known only for susceptible animals, and half of the data set is usually censored using LD_{50} in disease challenge tests, in which only the minimum survival time is known for survivors (right-censored data) (Ødegård et al., 2011). The *F. orientalis* strain isolated from diseased juvenile Nile tilapia (strain LAPOA OR514621), kept in ultra freezer and reactivated on modified Muller Hinton agar (MMH) supplemented with fetal bovine serum (3%), glucose (1%), and L-cysteine chloride (0.1%) for 72 hours at 24 °C. Subsequently, a pure colony was transferred to MMH broth for 36 hours at 24 °C in a shaker at 170 rpm. After bacterial growth, the culture medium was washed by centrifugation (4°C, 3,000G, 10 min; Eppendorf Centrifuge 5810) and the bacterial pellet was eluted in sterile phosphate-buffered saline (PBS).

After identifying the LD_{75} , bacterial suspension was adjusted spectrophotometrically to $OD_{600} = 0.003$ nm and the accurate bacterial density (CFU

mL⁻¹) was calculated through serial dilution using plate counting method. A bacterial inoculum with a concentration of 2.3×10^6 CFU/mL was used in the final challenge to evaluate resistance in Nile tilapia. Before the challenge, a subsample of the experimental population was collected to check for the presence of *F. orientalis* and other pathogens, such as *Streptococcus agalactiae*, *Flavobacterium oreochromis* and *Aeromonas hydrophila*, by routine microbiological tests (all tests were negative).

For the final challenge test, 1,330 animals ($20.96\text{g} \pm 11.7$) were used from each of the 66 families (approximately 20 animals/family). The experiment was performed in a water recirculation system, with mechanical and biological filters, consisting of 9 tanks of 750L, under controlled water conditions, with a temperature of 30 ± 0.5 °C, pH 7.2 and dissolved oxygen greater than 5.0 mg/L. The *F. orientalis* development is accelerated at lower temperatures ($< 25^\circ\text{C}$) (Soto et al., 2012). However, mortalities caused by this disease were also reported in Brazil at higher temperatures (F. Pilarski, personal communication). For this reason, we decided to evaluate animals in both conditions. Each family was distributed in nine tanks with 2 to 3 fish per family each, resulting in approximately 150 animals in each tank (Table 2). These animals were inoculated intraperitoneally with the inoculum (0.1ml/10g of fish). In addition, to avoid unnecessary use of animals in the experiment, only one additional replicate was used as an inoculation control group. The control animals were injected with PBS solution to exclude the possibility of mortality caused by handling and inoculation stress. The control group was also evaluated in a recirculation system, with the same water quality and tank size parameters.

Table 2. Descriptive statistics of Nile tilapia time of death (TD) and initial weight per tank in *F. orientalis* sequential challenges.

Challenge 1 (G0 = 66 families)		Time of Death (Hours)			Initial weight (g)		
Tank	N	Mean \pm SD	Min.	Max.	Mean \pm SD	Min.	Max
1	150	76.42 \pm 20.36	44.42	163	19.75 \pm 10.11	6	54
2	150	86.82 \pm 42.01	42.17	262.47	19.41 \pm 10.4	4	45
3	145	80.47 \pm 32.08	40.88	309.39	20.01 \pm 10.45	5	53
4	149	66.58 \pm 15.62	41.17	118	21.48 \pm 11.88	5	57
5	145	70.19 \pm 27.56	39.87	308.26	20.43 \pm 11.89	6	63
6	149	66.44 \pm 17.59	40.43	138.17	22.46 \pm 13.15	6	58
7	148	77.08 \pm 32.25	38.75	307.18	19.93 \pm 10.94	5	57
8	146	69.33 \pm 21.54	42.87	167.76	22.37 \pm 12.11	5	59
9	148	69.88 \pm 22.76	38.93	167.45	22.78 \pm 13.61	4	66
Overall	1330	73.70 \pm 27.68	38.75	309.39	20.96 \pm 11.7	4	66
Challenge 2 (G1 = 106 selected families/6 controls)							
1	299	56.45 \pm 7.93	42.6	99.07	13.32 \pm 9.18	3	55
2	305	57.58 \pm 19.98	41.9	228.08	12.96 \pm 10.17	3	96
3	294	58.35 \pm 18.16	41.03	226	13.02 \pm 10.45	3	64
Control	60	56.10 \pm 5.10	43.22	67.56	9.85 \pm 4.22	3	24
Overall (with control)	958	57.30 \pm 15.23	41.03	228.08	13.08 \pm 9.91	3	96
Overall (no control)	898	56.80 \pm 12.23	41.03	228.08	12.80 \pm 9.74	3	94

The challenge was performed over a period of 21 days to evaluate two resistance traits: binary survival (BS, 0=alive and 1=dead) and time to death (in hours). At the time of inoculation, body weight was recorded. During the challenge, clinical and behavioral signs of infected fish were observed: exophthalmia, darkening of the skin, isolation from the group, loss of appetite, erratic swimming, ascites, among others. Only dead animals with clinical signs were counted as susceptible. When mortality was detected, the animal was removed from the experiment and the exact day and time of

the event were recorded. Mortality was checked every 15 min during the first five days and then at 8h intervals for the remaining days. To confirm the cause of death by *F. orientalis*, spleen and kidney tissue samples were collected from some fish for isolation of the bacteria and standard identification by microbiology.

3.4 Genetic parameters estimation and production of G1.

The resistance phenotypes were analyzed using a univariate animal model, as defined below:

$$y = X\beta + Za + e$$

where y is the vector of phenotypes (TD and BS), β is the vector of fixed effects (tank as fixed effect, and initial weight and age as covariate), a is a vector of random additive polygenic genetic effects that follows a normal distribution $\sim N(0, A\sigma_a^2)$, where σ_a^2 is the additive genetic variance and A is the relationship matrix using pedigree. X and Z are incidence matrices, and e is the random residual error with a distribution $\sim N(0, I\sigma_e^2)$, where I is an identity matrix and σ_e^2 is the residual variance. The linear model was adjusted using the BLUPF90 package (Miszta et al., 2016).

Heritability (h^2) was estimated for both traits using the model mentioned above to obtain the variance components that were applied in the following formula:

$$h^2 = \frac{\sigma_a^2}{\sigma_a^2 + \sigma_e^2}$$

where σ_a^2 and σ_e^2 are the additive and residual genetic variances for each trait, respectively.

After the estimation of genetic parameters, the estimated breeding values (EBVs) were obtained to perform the ranking of families and selection. We selected the top 30 families to be the mated and form the generation 1 (G1). The selection of breeders for the composition of genetically improved families also considered the control of inbreeding, i.e., the mating of superior genotypes with related animals was avoided. We also formed six families used as controls for the selection process, whose breeders were those that had the worst EBV values. The process of obtaining the second generation resulted in 112 families, of which six were constituted as controls. The families were established according to the same protocols mentioned in the section 2.2. The reproduction was performed in breeding hapas with male-to-female ratio of 1:2. In this way, half and full-sib families were formed decreasing the potential common environment effect (Kong et al., 2020).

3.5 Second challenge

Similar to the first challenge, the LD₇₅ of the bacterial strain *F. orientalis* was defined to be used in the challenge of the G1. The procedures were basically the same, but at this time, the 0.007 dose had 75% survival, with mortality occurring up to 5 days after inoculation.

In total, 112 families (106 resistance and 6 control families) were used for the second challenge (G1), with an average of 8.5 ± 2.1 animals per family totaling 952 animals. Each family was distributed into three random replicates (tank), i.e., approximately 3 fish per family in each tank. The challenge was carried out in a water

recirculation system with mechanical and biological filters, consisting of three 2,000-liter tanks, under controlled water conditions, with a temperature of 21 ± 0.5 °C, pH 7.2 and dissolved oxygen greater than 5.0 mg/l. Only one additional replicate was used as inoculation control group, injected with PBS saline solution, in a similar water recirculation system. Before starting the challenge, the experimental population was confirmed as pathogen-free by routine microbiological tests. Phenotype recording was performed as mentioned in the section 2.3, and the same resistance phenotypes were evaluated during the 21 days of experimental challenge. We performed this challenge in a lower temperature to evaluate the possible occurrence of genotype-by-environment interaction regarding the resistance in both temperatures. The genotype-by-environment interaction was evaluated using a bivariate animal model:

$$\begin{bmatrix} y_1 \\ y_2 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} X_1 & 0 \\ 0 & X_2 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} b_1 \\ b_2 \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} Z_1 & 0 \\ 0 & Z_2 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} a_1 \\ a_2 \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e_1 \\ e_2 \end{bmatrix}$$

where subscripts 1 and 2 represent the resistance traits in both challenges and the other effects are the same as described above. The genetic correlation among traits were calculated to indicate the occurrence of genotype-by-environment interaction:

$$r_g = \frac{\sigma_{y_1 y_2}}{\sqrt{\sigma_{y_1}^2 \sigma_{y_2}^2}}$$

where $\sigma_{y_1 y_2}$ the additive genetic covariance between the trait y_1 e y_2 and $\sigma_{y_1}^2$ and $\sigma_{y_2}^2$ are the additive genetic variances for both traits, respectively.

3.6 Response to selection (ΔG)

The genetic parameters for the second challenge were estimated using the same model described in the section 2.4. In addition, a model integrating both

challenges were also applied for the estimation of genetic parameters using the same fixed and random effects but adding the challenge number also as fixed effect. The realized (ΔG_R) response to selection was estimated using the BS trait. We did not use the TD trait because the mortality was faster in the second challenge (most likely due to a higher virulence of the bacterium strain) which would cause a negative ΔG_R . The ΔG_R was estimated by subtracting the median of the EBV at family level of the G0 and G1 (selected and control families). In this way, we could also compare the effect of selection over G1 and control. We also estimated the expected response to selection (ΔG_E) assuming the genetic parameters of the TD trait in the second challenge. We used the breeder's equation (Falconer and Mackay, 1996) to estimate ΔG_E assuming different scenarios. The equation was:

$$\Delta G_E = \frac{i h_{G1}^2 \sigma_P}{L}$$

where i is the standardized selection intensity, h_{G1}^2 is the heritability of the TD in the G1, σ_P is the phenotypic standard deviation of TD and L is the generation interval in years. Different values of i were used to estimate the ΔG_E to show the potential of selection.

4 Results

4.1 Experimental challenges

The results of time of death (TD) after both challenges are shown in Table 2. The mean TD in the first challenge (G0) was lower than the second challenge (G1), 73.70 ± 27.68 and 56.59 ± 17.27 , respectively. This can also be visualized in the Kaplan-Meier curves (Figure 1) of averages families in which G0 presented a slower mortality rate in comparison to G1. This most likely happened due to differences in the

temperature and instability in the virulence of the *F. orientalis* strain in both challenges. However, in comparison to the control families (G1 control), the selected families (G1 resistance) presented higher TD and, the maximum TD in control families was 67 hours while in the selected families it was 228. This shows the potential of selection to increase *F. orientalis* resistance in Nile tilapia under controlled challenges. Another difference between generations comparing both challenges is related to the weight at challenge (20.96 ± 11.7 and 13.08 ± 9.91 for G0 and G1, respectively).

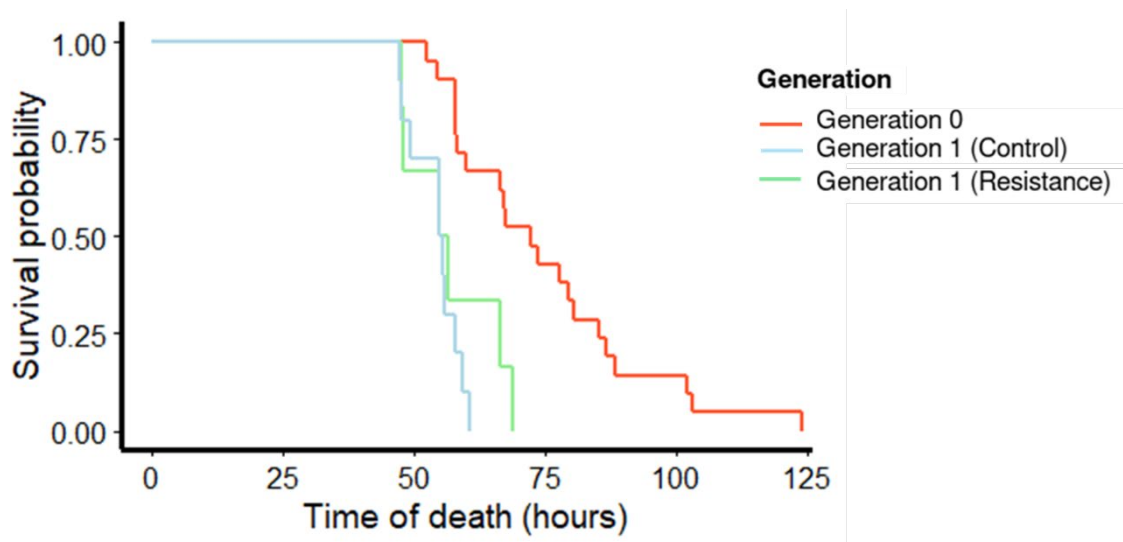


Figure 1. Kaplan-Meier curves for *Francisella orientalis* experimental challenge in Nile Tilapia. Average survival families of each generation were represented in green (first challenge), blue (second challenge) and red (control families of second challenge) curves.

4.2 Genetic parameters and response to selection (ΔG)

The genetic parameters (genetic and residual variances and heritabilities) were estimated for G0, G1 and G0+G1 (Table 3). For TD, the lowest h^2 estimate was observed when only G1 was included in the model (0.282 ± 0.08). This estimate was

41.5% higher when including only G0 and 110.3% for G0+G1. Similarly, for BS, the G1 showed the lowest h^2 (0.295 ± 0.08) followed by G0 and G0+G1, 0.470 ± 0.08 and 0.517 ± 0.06 , respectively. These results show moderate and significant genetic additive variance for resistance to *F. orientalis* indicating that this trait could respond to selection efficiently. The effect of selection was also observed in the mean EBVs for TD at family level where the mean EBV of control families was the lowest in comparison to other 106 resistance families (Figure 2). The variation in the EBV at family level demonstrates that there is still genetic variance for resistance enabling more rounds of selection. The genetic correlations between both challenges were high and positive (0.92 ± 0.03 for TD and 0.88 ± 0.04 for BS; Table 3) showing that there is lack of genotype-by-environment interaction, i.e., both temperatures can be used for controlled challenges without re-ranking effect for EBVs.

Table 3. Genetic parameters for time of death (TD) and binary survival (BS) for two Nile tilapia generations challenged for *F. orientalis*.

Time of death				
Generation	$\sigma_g^2 \pm SE^1$	$\sigma_e^2 \pm SE^2$	$h^2 \pm SE^3$	$r_g \pm SE^4$
G0	282.63 ± 56.89	420.82 ± 42.77	0.399 ± 0.07	0.92 ± 0.03
G1	69.0 ± 20.31	172.75 ± 15.31	0.282 ± 0.08	
G0+G1	323.71 ± 52.09	218.83 ± 32.66	0.593 ± 0.07	
Binary Survival				
G0	0.112 ± 0.022	0.125 ± 0.016	0.470 ± 0.08	0.88 ± 0.04
G1	0.073 ± 0.021	0.172 ± 0.016	0.295 ± 0.08	
G0+G1	0.136 ± 0.020	0.125 ± 0.013	0.517 ± 0.06	

¹ σ_g^2 : genetic variance \pm standard error

² σ_e^2 : residual variance \pm standard error

³ h^2 : heritability \pm standard error

⁴ r_g : genetic correlation \pm standard error

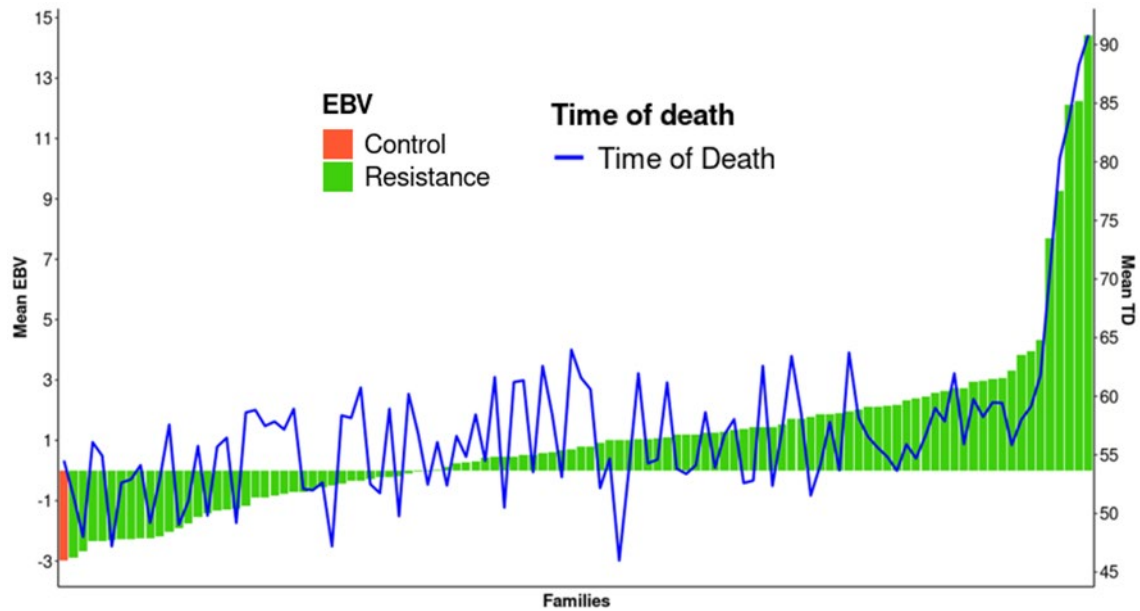


Figure 2. Mean EBV for 106 resistance families (green bars) and 6 control families (red bar) from generation 1 challenged for *Francisella orientalis*. Blue line indicates the mean time of death of each family.

The realized response to selection (ΔG_R) was evaluated for each generation and comparing G1 control and resistance groups. The median for EBVs for BS at family level was -0.144, -0.0638 and 0.0122 for G1 control, G0 and G1 resistance, respectively. The ΔG_R among groups is available on Figure 3. A positive effect of selection of more resistant animals as the median EBV was 108.5% higher comparing the G1 resistant animals to the G1 control group (ΔG_3). We also assessed the expected response to selection (ΔG_E) using the genetic parameters of G1 resistance group to predict the expected genetic gain in the next generation (Table 4). Selection intensities (i) from 50 to 1% were simulated in different scenarios keeping the other parameters constant. The ΔG_E varied from 33 to 109 hours according to the intensity of selection.

This means that we could expect an increase of 64 hours in the mean TD of the G2 population if we select 15% of best animals from G1, for example.

Table 4. Selection response for time of death (TD) in Nile tilapia challenged for *F. orientalis* (Generation interval = 1).

Selection intensity (<i>i</i>) ¹	Expected response (ΔG_E) ²
50%	33
40%	40
30%	48
20%	57
15%	64
10%	72
5%	85
1%	109

¹Standardized selection intensity

²Expressed in hours

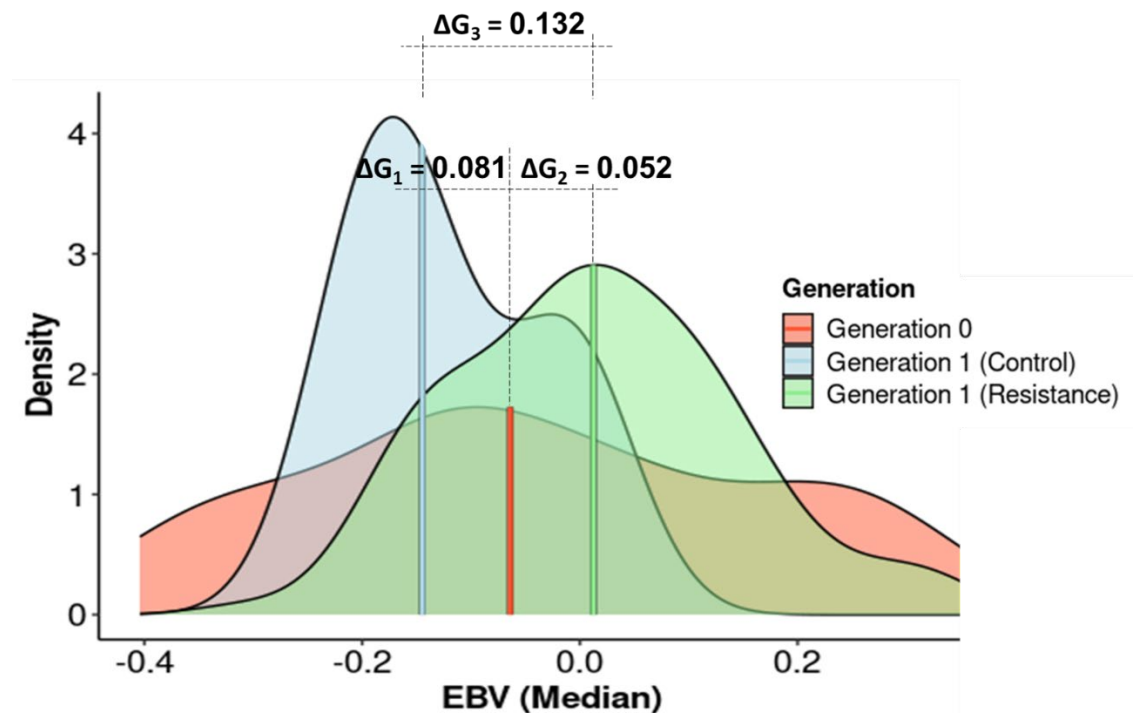


Figure 3. EBV density curves for two *Francisella orientalis* experimental challenges in Nile Tilapia. Solid blue, red and green lines indicate mean EBV for binary survival (BS) at family level for G1 (control), G0 and G1 (Resistance), respectively. ΔG is the genetic gain subtracting the median EBV of each group.

5 Discussion

F. orientalis was previously known as *F. noatunensis* subsp. *orientalis* (Ramirez-Paredes et al., 2020) and it was already reported in the main Nile tilapia producers countries, such as Brazil (Leal et al., 2014), China (Lin et al., 2016), Indonesia (Ottem et al., 2009) and Thailand (Nguyen et al., 2016). Different mortality rates have been observed in natural outbreaks from 30-60% (Leal et al., 2014; Rodrigues et al., 2018) up to 95% (Chern and Chao, 1994). This variation in mortality rate was also observed in our study as the mortality in the second challenge (mean TD = 57.30 ± 15.23) was faster than the observed in the first one (mean TD = 73.70 ± 27.68). The main factor associated to the development of francisellosis is the temperature. Temperatures below 24°C can accelerate the development of the disease (Birkbeck et al., 2011; Colquhoun and Duodu, 2011; Soto et al., 2012), causing it to be known as a "winter disease". Pereira et al. (2019) evaluated the effect of temperature in the transcription profile of *F. orientalis* genes and found that temperature variation may regulate the expression of genes related to oxidative stress and thermal shock showing a possible mechanism of the pathogen to modulate its activity according to the environmental temperature. In our study, the mean temperature in the first challenge was 30°C while it was 21°C in the second challenge, which may have influenced the differences in mortality rates. However, the genotype-by-environment interaction effect was low comparing different temperatures showing that the biological mechanisms for resistance are most likely similar despite these differences. Additionally, even using the same *F. orientalis* isolate and inoculation protocol in both trials, maintaining the virulence steady across

challenges is inherently complex. The host-pathogen interactions during disease challenges involve numerous variables, making it difficult to control and reproduce virulence consistently (Kennedy et al., 2016).

The genetic parameters for *F. orientalis* resistance in Nile tilapia were estimated in other two studies. Joshi et al. (2021) found 0.51 ± 0.06 and 0.37 ± 0.05 h^2 estimates for TD and BS in a challenge with 220 families. Conversely, in the present study, we found higher h^2 estimates for TD (0.399 ± 0.07 and 0.282 ± 0.08 TD) in comparison to BS (0.470 ± 0.08 and 0.295 ± 0.08) for G0 and G1, respectively. Several factors may explain these differences. Joshi et al. (2021) performed a bacterial immersion protocol and mortality was evaluated for 8 weeks with the mean TD around day 50. Our challenge was performed using intraperitoneal injection and the mortality peak was within the first 3 days of challenge. There is no consensus about the most suitable method of infection in aquaculture disease challenges. Some researchers argue that simulating a natural infection is a more suitable strategy. Consequently, immersion or oral methods would expose the pathogen directly to the innate immune system found in the skin and gills (Soto et al., 2016). However, by using these methods, it is difficult to certify that all animals were equally exposed to bacteria, which can lead to variability in infection rates and late mortality (He et al., 2021). Injecting the pathogen, on the other hand, ignores the first natural line of defense, but it allows for a more controlled number of bacteria to be administered. This method provides a consistent dosage, evaluating the fish immune response under controlled conditions and comparing the innate response of fish facing the disease. More research is necessary to evaluate the best strategy to fully challenge the fish's organism facing an infection which may include

evaluating alternative phenotypes such as bacterial load and hematological/biochemical parameters.

Shoemaker et al. (2022) also evaluated the genetic parameters for *F. orientalis* resistance in Nile tilapia. They also applied intraperitoneal injection, but using heavier animals (90-180g vs. 10-20g). They estimated a h^2 of 0.31 ± 0.05 for BS considering all generations challenged which is in the interval of the h^2 estimates found in our study for the same trait. Although some differences are present among the three studies, for all of them, a significant proportion of genetic additive variance was reported indicating that *F. orientalis* resistance can be improved through genetic selection.

The selection response was evaluated in two ways: comparing selected vs. control families and comparing G0 and G1. The control families presented the worst mean EBV values in comparison to the selected families. This clearly shows the potential to selection for this trait as after just one cycle of selection, we were able to improve the mean TD of families. In addition, a high variation was observed at the EBV family levels showing that this trait could be selected for more generations. The potential of selection in the future generations was also calculated using the ΔG_E . An increase from 33 to 109 hours in survival would be expected according to the selection intensity applied.

Comparing generations, the same positive effect of selection was observed in the ΔG_R . Response to selection studies for disease resistance are scarce in aquaculture species. Gjedrem and Rye (2016) reviewed the reports of response to selection for disease resistance and found only seven studies addressing this parameter, none of them for Nile tilapia. We found a 57% increase in the mean EBV at

family level for BS trait comparing G0 and G1. This result is higher than the increase rate reported for Nile tilapia for weight gain (~17% generation) also using EBV comparisons across generations (Bentsen et al., 2017). We cannot rule out that the genetic response might be overestimated due to potential inflated heritability values in G0, because of the experimental design used for family formation, where some sires were considered unknown. Moreover, as discussed previously, the reproduction of controlled challenges at same conditions are complex and binary traits are less informative than quantitative traits, as they have a limited distribution (Meuwissen et al., 1995), hardening the calculation of selection response. Despite these drawbacks, our results showed a substantial potential for improving *F. orientalis* resistance in order to achieve higher productivity and sustainability of Nile tilapia aquaculture.

6 Conclusion

Despite challenges in maintaining consistent experimental conditions, the moderate heritability estimates suggested that *F. orientalis* resistance has a significant additive genetic compound. By comparing selected vs control families and G0 vs G1, our study showed that selective breeding can significantly improve the resistance, with potential for rapid genetic gains across generations. These findings support the potential for breeding programs to enhance disease resistance in Nile tilapia, promoting more sustainable and productive aquaculture.

Acknowledgments

We would like to thank Gustavo Frazile for his help in the experiment and for the management of animals during the formation of families.

Funding

The study received support from the São Paulo Research Foundation (FAPESP) grant numbers: 2021/11955-8, 2023/01889-3 and 2023/01942-1, the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, grant 312250/2021-5 and 305092/2023-5), and the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel – Brazil (CAPES Print - Financial Code 001)

Conflict of interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the study reported in this paper.

Author's contribution

BFG: Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Writing - Original Draft and Writing - Review & Editing. JARA: Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Writing - Original Draft and Writing - Review & Editing. MSSF: Methodology, Writing - Review & Editing. ELS: Methodology, Writing - Review & Editing. JFGA: Methodology, Formal analysis and Writing - Review & Editing. VAMF: Methodology, Writing - Review & Editing. SCSM: Methodology, Writing - Review & Editing. CSP: Methodology, Writing - Review & Editing. DCD: Writing - Review & Editing. AFGL: Methodology, Writing -

Review & Editing. MJTRP: Supervision, Writing - Review & Editing. FSF: Writing - Review & Editing. LT: Supervision, Writing - Review & Editing. FP: Writing - Review & Editing. DTH: Conceptualization, Methodology, Supervision and Writing - Review & Editing. BFG and JARA contributed equally for this study. All authors contributed to the design of the study, discussion of results and review of the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript.

7 References

- Bentsen, H.B., Gjerde, B., Eknath, A.E., de Vera, M.S.P., Velasco, R.R., Danting, J.C., Dionisio, E.E., Longalong, F.M., Reyes, R.A., Abella, T.A., Tayamen, M.M., Ponzoni, R.W., 2017. Genetic improvement of farmed tilapias: Response to five generations of selection for increased body weight at harvest in *Oreochromis niloticus* and the further impact of the project. *Aquaculture* 468, 206–217. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2016.10.018>
- Birkbeck, T.H., Feist, S.W., Verner-Jeffreys, D.W., 2011. Francisella infections in fish and shellfish. *J. Fish Dis.* 34, 173–187. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2761.2010.01226.X>
- Bohle, H., Tapia, E., Martínez, A., Rozas, M., Figueroa, A., Bustos, P., 2009. *Francisella philomiragia*, bacteria asociada con altas mortalidades en salmones del Atlántico (*Salmo salar*) cultivados en balsas-jaulas en el lago Llanquihue. *Arch. Med. Vet.* 41, 237–244. <https://doi.org/10.4067/S0301-732X2009000300008>
- Chern, R.S., Chao, C.B., 1994. Outbreaks of a Disease Caused by Rickettsia-like Organism in Cultured Tilapias in Taiwan. *Fish Pathol.* 29, 61–71.

<https://doi.org/10.3147/JSFP.29.61>

Colquhoun, D.J., Duodu, S., 2011. Francisella infections in farmed and wild aquatic organisms. *Vet. Res.* 42, 1–15. [https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-](https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-47/TABLES/5)

[47/TABLES/5](https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-47/TABLES/5)

Falconer, D.S., Mackay, T.F.C., 1996. Introduction to quantitative genetics., 4th ed, Introduction to quantitative genetics. Longmans Green, Harlow, Essex, UK.

FAO, F. and A.O. of the U.N., 2024. FishStat: Global aquaculture production 1950-2022 [WWW Document].

Fessehaye, Y., El-bialy, Z., Rezk, M.A., Crooijmans, R., Bovenhuis, H., Komen, H., 2006. Mating systems and male reproductive success in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in breeding hapas: A microsatellite analysis. *Aquaculture* 256, 148–158. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2006.02.024>

Gjedrem, T., 2005. Selection and breeding programs in aquaculture, Selection and Breeding Programs in Aquaculture. AKVAFORSK, Institute of Aquaculture Research AS, Norway. <https://doi.org/10.1007/1-4020-3342-7>

Gjedrem, T., Rye, M., 2016. Selection response in fish and shellfish: A review. *Rev. Aquac.* 1–12. <https://doi.org/10.1111/raq.12154>

He, R.Z., Li, Z.C., Li, S.Y., Li, A.X., 2021. Development of an immersion challenge model for *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*).

Aquaculture 531, 735877.

<https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2020.735877>

Joshi, R., Almeida, D.B., da Costa, A.R., Skaarud, A., de Pádua Pereira, U., Knutsen, T.M., Moen, T., Alvarez, A.T., 2021. Genomic selection for resistance to

- Francisellosis in commercial Nile tilapia population: Genetic and genomic parameters, correlation with growth rate and predictive ability. *Aquaculture* 537, 736515. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2021.736515>
- Kennedy, D.A., Kurath, G., Brito, I.L., Purcell, M.K., Read, A.F., Winton, J.R., Wargo, A.R., 2016. Potential drivers of virulence evolution in aquaculture. *Evol. Appl.* 9, 344–354. <https://doi.org/10.1111/EVA.12342>
- Kong, Z., Kong, J., Hao, D., Lu, X., Jian, T., Meng, X., Luo, K., Cao, B., Sui, J., Li, X., Luan, S., 2020. Reducing the Common Environmental Effect on *Litopenaeus vannamei* Body Weight by Rearing Communally at Early Developmental Stages and Using a Reconstructed Pedigree. *J. Ocean Univ. China* 2020 194 19, 923–930. <https://doi.org/10.1007/S11802-020-4324-5>
- Leal, C., Tavares, G., Figueiredo, H., 2014. Outbreaks and genetic diversity of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* isolated from farm-raised Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Brazil. *Genet. Mol. Res.* 13, 5704–5712. <https://doi.org/10.4238/2014.July.25.26>
- Lin, Q., Li, N., Fu, X., Hu, Q., Chang, O., Liu, L., Zhang, D., Wang, G., San, G., Wu, S., 2016. An outbreak of granulomatous inflammation associated with *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* in farmed tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*) in China. *Chinese J. Oceanol. Limnol.* 34, 460–466. <https://doi.org/10.1007/S00343-016-4311-2/METRICS>
- Meuwissen, T.H., Engel, B., van der Werf, J.H., 1995. Maximizing selection efficiency for categorical traits. *J. Anim. Sci.* 73, 1933–1939. <https://doi.org/10.2527/1995.7371933X>

- Misztal, I., Tsuruta, S., Lourenco, D., Masuda, Y., Aguilar, I., 2016. Manual for BLUPF90 Family of Programs. Univ. Georg. Athens, GA.
- Nguyen, N.H., 2024. Genetics and Genomics of Infectious Diseases in Key Aquaculture Species. Biol. 2024, Vol. 13, Page 29 13, 29.
<https://doi.org/10.3390/BIOLOGY13010029>
- Nguyen, V.V., Dong, H.T., Senapin, S., Pirarat, N., Rodkhum, C., 2016. *Francisella noatunensis subsp. orientalis*, an emerging bacterial pathogen affecting cultured red tilapia (*Oreochromis sp.*) in Thailand. Aquac. Res. 47, 3697–3702.
<https://doi.org/10.1111/ARE.12802>
- Ødegård, J., Baranski, M., Gjerde, B., Gjedrem, T., 2011. Methodology for genetic evaluation of disease resistance in aquaculture species: challenges and future prospects. Aquac. Res. 42, 103–114. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02669.x>
- Oliveira-Neto, R.R., Antonio Mastrochirico-Filho, V., cio Mateus Assane, I., Belini Ariede, R., Vieira Freitas, M., Fredy Gómez Agudelo, J., Heloisa Souza Borges, C., Gornati Gonçalves, T., Valeria Guerra Lira, L., Reis Neto, R. V, Pilarski, F., Teruo Hashimoto, D., Soltani, M., Adel, M., Duman, M., Smirnov, M., 2024. Resistance of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus* from Brazilian populations to *Streptococcus agalactiae* (serotype Ib and ST-NT). Front. Aquac. 3, 1354029. <https://doi.org/10.3389/FAQUC.2024.1354029>
- Oliveira, T.F., Quieróz, G.A., Leibowitz, M.P., Gomes Leal, C.A., 2022. Development of an inactivated whole cell vaccine through immersion for immunoprophylaxis of *Francisella orientalis* infections in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.)

fingerlings and juveniles. *Fish Shellfish Immunol.* 127, 405–411.

<https://doi.org/10.1016/J.FSI.2022.06.040>

Ostland, V.E., Stannard, J.A., Creek, J.J., Hedrick, R.P., Ferguson, H.W., Carlberg, J.M., Westerman, M.E., 2006. Aquatic *Francisella*-like bacterium associated with mortality of intensively cultured hybrid striped bass *Morone chrysops* × *M.*

saxatilis. *Dis. Aquat. Organ.* 72, 135–146. <https://doi.org/10.3354/DAO072135>

Ottem, K.F., Nylund, A., Karlsbakk, E., Friis-Møller, A., Kamaishi, T., 2009. Elevation of *Francisella philomiragia* subsp. *noatunensis* to *Francisella noatunensis* comb. nov. [syn. *Francisella piscicida* Ottem et al. (2008) syn. nov.] and characterization of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* subsp. nov., two important fish pathogens. *J. Appl. Microbiol.* 106, 1231–1243. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2672.2008.04092.X>

Pereira, F.L., Tavares, G.C., de Carvalho, A.F., Rosa, J.C.C., Rezende, C.P., Leal, C.A.G., Figueiredo, H.C.P., 2019. Effects of temperature changes in the transcriptional profile of the emerging fish pathogen *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis*. *Microb. Pathog.* 133, 103548.

<https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2019.103548>

Pulpipat, T., Maekawa, S., Wang, P.C., Chen, S.C., 2020. Immune Responses and Protective Efficacy of a Formalin-Killed *Francisella Noatunensis* Subsp. *Orientalis* Vaccine Evaluated through Intraperitoneal and Immersion Challenge Methods in *Oreochromis Niloticus*. *Vaccines* 2020, Vol. 8, Page 163 8, 163.

<https://doi.org/10.3390/VACCINES8020163>

Ramirez-Paredes, J.G., Larsson, P., Thompson, K.D., Penman, D.J., Busse, H.J.,

- Öhrman, C., Sjödin, A., Soto, E., Richards, R.H., Adams, A., Colquhoun, D.J., 2020. Reclassification of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* ottem et al. 2009 as *Francisella orientalis* sp. nov., *Francisella noatunensis* subsp. *chilensis* subsp. nov. and emended description of *Francisella noatunensis*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 70, 2034–2048.
<https://doi.org/10.1099/IJSEM.0.004009/CITE/REFWORKS>
- Ramírez-Paredes, J.G., Mendoza-Roldan, M.A., Lopez-Jimena, B., Shahin, K., Metselaar, M., Thompson, K.D., Penman, D.J., Richards, R.H., Adams, A., 2019. Whole cell inactivated autogenous vaccine effectively protects red Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) against francisellosis via intraperitoneal injection. J. Fish Dis. 42, 1191–1200. <https://doi.org/10.1111/JFD.13041>
- Rodrigues, M.V., Francisco, C.J., David, G.S., da Silva, R.J., Falcone-Dias, M.F., Júnior, J.P.A., 2018. Monitoring of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* in farmed Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Brazil. Aquac. Int. 26, 127–138.
<https://doi.org/10.1007/S10499-017-0204-4/TABLES/3>
- Shoemaker, C.A., Lozano, C.A., LaFrentz, B.R., Mumma, P., Vela-Avitúa, S., Ospina-Arango, J.F., Yazdi, M.H., Rye, M., 2022. Additive genetic variation in resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to *Francisella orientalis* and its genetic (co)variation to both harvest weight and resistance to *Streptococcus agalactiae* Ib. Aquaculture 561, 738736.
<https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2022.738736>
- Soto, E., Abrams, S.B., Revan, F., 2012. Effects of temperature and salt concentration on *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* infections in Nile tilapia *Oreochromis*

- niloticus*. Dis. Aquat. Organ. 101, 217–223. <https://doi.org/10.3354/DAO02533>
- Soto, E., Hawke, J.P., Fernandez, D., A Morales, J., 2009. *Francisella sp.*, an emerging pathogen of tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), in Costa Rica. J. Fish Dis. 32, 713–722. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2761.2009.01070.X>
- Soto, E., Kidd, S., Gaunt, P.S., Endris, R., 2013. Efficacy of florfenicol for control of mortality associated with *Francisella noatunensis subsp. orientalis* in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). J. Fish Dis. 36, 411–418. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2761.2012.01425.X>
- Soto, E., Shahin, K., Johnny Talhami, J., Griffin, M.J., Adams, A., Gustavo Ramírez-Paredes, J., 2019. Characterization of *Francisella noatunensis subsp. orientalis* isolated from Nile tilapia *Oreochromis niloticus* farmed in Lake Yojoa, Honduras. Dis. Aquat. Organ. 133, 141–145. <https://doi.org/10.3354/DAO03333>
- Soto, E., Zayas, M., Tobar, J., Illanes, O., Yount, S., Francis, S., Dennis, M.M., 2016. Laboratory-controlled Challenges of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) with *Streptococcus agalactiae*: Comparisons between Immersion, Oral, Intracoelomic and Intramuscular Routes of Infection. J. Comp. Pathol. 155, 339–345. <https://doi.org/10.1016/J.JCPA.2016.09.003>
- WorldFish Center, 2004. GIFT technology manual: an aid to tilapia selective breeding | WorldFish, 1st ed. Penang, Malaysia.
- Yáñez, J.M., Barría, A., Lopez, M.E., Moen, T., Garcia, B.F., Yoshida, G.M., Xu, P., 2022. Genome-wide association and genomic selection in aquaculture. Rev. Aquac. 14, 1–31. <https://doi.org/10.1111/RAQ.12750>
- Yáñez, J.M., Newman, S., Houston, R.D., 2015. Genomics in aquaculture to better

understand species biology and accelerate genetic progress. *Front. Genet.* 6, 1–3. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00128>