

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Flavobacterium columnare* DE TILÁPIA DO NILO E PIRACANJUBA POR MEIO DE RAPD-PCR

Fernanda de Alexandre SEBASTIÃO¹; Fabiana PILARSKI²; Manoel Victor Franco LEMOS³

RESUMO

Flavobacterium columnare é uma bactéria cosmopolita, agente etiológico da columnariose e considerado um dos maiores problemas na aquicultura brasileira, provocando elevadas taxas de mortalidade e grande prejuízo econômico. Qualidade de água inadequada, manejo zootécnico excessivo, alta densidade de estocagem e variações na temperatura da água são os principais fatores que contribuem para a ocorrência da columnariose. Para a realização de um estudo epidemiológico de sucesso e controle desta enfermidade, é essencial a distinção da *F. columnare* das demais bactérias de pigmentação amarelada. Para tanto, o objetivo do presente trabalho foi caracterizar molecularmente, por meio da técnica de RAPD-PCR, duas cepas de *F. columnare* isoladas de *Oreochromis niloticus* e *Brycon orbignyanus*. Os dados foram analisados como binários (0 e 1) e uma matriz de similaridade genética foi gerada pelo coeficiente de Jaccard. A análise de agrupamento foi realizada pelo método neighbor joining. A técnica de RAPD-PCR confirmou ser uma ferramenta importante para obtenção do perfil genético dos isolados de *F. columnare* a partir dos oligonucleotídeos utilizados e para verificação da similaridade genética.

Palavras-chave: Bactéria; peixe; *Oreochromis niloticus*; *Brycon orbignyanus*

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *Flavobacterium columnare* ISOLATES FROM NILE TILAPIA AND PIRACANJUBA BY RAPD-PCR

ABSTRACT

Flavobacterium columnare is a cosmopolite bacteria and it is one of the main problem in Brazilian aquaculture, causing high mortalities index and economic damage. The main factors that contribute to columnaris disease are inadequate water quality, excess handling, high density of fish and temperature variations. For a successful epidemiological study and disease control, it is essential to differentiate the *F. columnare* from other yellow pigmentation bacteria. The present study used molecular techniques to characterize, by RAPD-PCR, two strains of *F. columnare* isolated from *Oreochromis niloticus* and *Brycon orbignyanus*. Data were analyzed as binary (0 and 1) and a genetic similarity matrix was generated by Jaccard's coefficient. Cluster analysis was performed by the neighbor joining method. The RAPD-PCR technique confirmed to be a usefull tool to obtain genetic profiles from *F. columnare* isolates based on the oligonucleotides used and to verify genetic similarity.

Keywords: Bacteria; fish; *Oreochromis niloticus*; *Brycon orbignyanus*

Artigo Científico: Recebido em 09/09/2010 – Aprovado em 09/03/2011

¹ Mestre em Microbiologia, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista – UNESP - Campus de Jaboticabal. Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane s/n – CEP: 14.884-900 - Jaboticabal - SP – Brasil

² Docente do Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP), Universidade Estadual Paulista. Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane s/n – CEP: 14.884-900 - Jaboticabal - SP – Brasil. e-mail: fabianap@caunesp.unesp.br

³ Docente da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista – UNESP - Campus de Jaboticabal. Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane s/n – CEP: 14.884-900 - Jaboticabal - SP – Brasil

INTRODUÇÃO

Flavobacterium columnare é o agente etiológico da columnariose, enfermidade comumente observada em pisciculturas de água doce, que ocasiona extensiva morbidade e mortalidade em peixes de todo o mundo, gerando impacto econômico apreciável (POWELL *et al.*, 2009). No Brasil, esta bactéria tem sido encontrada em espécies nativas e comercialmente importantes de peixes, incluindo tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*), piracanjuba (*Brycon orbignyanus*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*), tambaqui (*Colossoma macropomum*) e cascudo (*Hypostomus plecostomus*) (FIGUEIREDO *et al.*, 2005; PILARSKI *et al.*, 2008).

Tilápia do nilo é originária do rio Nilo (África), e se tornou, na última década, a espécie mais cultivada no Brasil, sendo responsável por aproximadamente 40% do volume da aquicultura nacional. (ZIMMERMANN e HASPER, 2003; MARENGONI, 2006; MPA, 2009). Piracanjuba é uma espécie migradora, de grande porte, outrora de ocorrência comum em toda a Bacia do Prata, porém, atualmente corre risco de extinção; é onívora, pertence à ordem Characiformes e família Characidae (HAHN *et al.*, 1997).

A columnariose é usualmente restrita às brânquias e superfícies externas do corpo do peixe. Os surtos ocorrem geralmente quando a temperatura da água está elevada e estão associados à elevada densidade de estocagem, que facilita a propagação do patógeno (KUNTTU *et al.*, 2009). A elevada concentração de amônia e matéria orgânica na água, ou os baixos níveis de oxigênio, também são fatores que favorecem as epizootias (DURBOROW *et al.*, 1998).

A resistência contra a bactéria é dependente da idade do peixe, sendo os alevinos e juvenis os mais susceptíveis, uma vez que seus mecanismos específicos de defesa não estão completamente desenvolvidos (SUOMALAINEN *et al.*, 2009).

A caracterização molecular tem sido utilizada para identificar diferentes genótipos de patógenos de uma forma segura e eficiente, além de ser mais rápida que os outros métodos fenotípicos. Vários autores encontraram variação intraespecífica entre os diversos isolados de *F. columnare* como FARMER (2004), que encontrou três subgrupos de *F. columnare* por meio da técnica de RAPD-PCR; ARIAS *et al.* (2004), DARWISH e ISMAIEL (2005)

descreveram três subgrupos de *F. columnare* ao utilizarem PCR-RFLP; SHOEMAKER *et al.* (2008) encontraram dois subgrupos entre seus isolados de *F. columnare* usando a técnica de ISR-SSCP; FLEMMING *et al.* (2007) identificaram dois subgrupos de *Flavobacterium johnsoniae* por meio de PCR-RFLP com a enzima HaeIII.

A determinação da prevalência de genótipos particulares em diferentes padrões de infecção pode auxiliar no desenvolvimento de métodos mais eficazes no controle de ictiopatologias (DARWISH e ISMAIEL, 2005). Todavia, quando não há o conhecimento prévio da sequência de nucleotídeos que flanqueiam uma sequência de DNA do organismo objeto de estudo, ou mesmo de algum de seus genes, uma opção é a técnica de RAPD-PCR. (MARQUES, 2003).

Apesar da importância da infecção por *F. columnare* no Brasil, poucos estudos na área de biologia molecular para o patógeno foram realizados. Portanto, o presente trabalho objetivou a caracterização molecular desta bactéria, isolada de tilápia do nilo e piracanjuba, por meio da técnica de RAPD-PCR, para verificar a similaridade dos isolados, visando destacar uma metodologia mais rápida e eficaz que o método tradicional com testes bioquímicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolados de Flavobacterium columnare

Os isolados de *F. columnare* utilizados neste trabalho, identificados como F1 e F2, pertencem à coleção de cepas do Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos (LAPOA) do Centro de Aquicultura da UNESP de Jaboticabal (CAUNESP) e foram previamente caracterizadas por métodos bioquímicos, como descrito por PILARSKI *et al.* (2008), e por PCR-RFLP do gene 16S rDNA, de acordo com SEBASTIÃO *et al.* (2010).

O isolado F1, é proveniente de tilápia do nilo (isolada em Jaboticabal, SP) e o isolado F2, de piracanjuba (isolada em Pirassununga, SP). Os peixes foram clinicamente diagnosticados como acometidos de columnariose pelo setor de Sanidade de Peixes do Centro de Pesquisa e Gestão de Recursos Pesqueiros Continentais (CEPTA/IBAMA de Pirassununga, SP).

Foi utilizada a linhagem DH5 α de *Escherichia coli*, proveniente do Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária da FCAV-UNESP, campus de Jaboticabal), como isolado-controle, por se tratar do microrganismo de uso recorrente como controle na rotina do laboratório citado.

Cultivo de *F. columnare* e *E. coli*

Os isolados de *F. columnare* foram cultivados em meio sólido, como descrito por CARLSON e PACHA (1968) e modificado por PILARSKI *et al.* (2008), para cultivo em países de clima tropical. As placas contendo as bactérias foram incubadas por 48 h, a 25°C.

A linhagem bacteriana de *E. coli* DH5 α foi cultivada em meio LB sólido (Acumedia®) e incubada por 12 horas, a 27°C.

Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada pelo método de resina de troca iônica InstaGene Matrix®, (Bio-Rad, Laboratório Hexiles, CA), de acordo com protocolo sugerido pelo fabricante.

O sobrenadante contendo cerca de 200 μ L de material genético foi transferido para tubo esterilizado e armazenado a -20°C.

RAPD-PCR

O procedimento para reações de amplificação do DNA, bem como a análise de PCR com oligonucleotídeos iniciadores decâmeros, foram realizados de acordo com WILLIAMS *et al.* (1993). Os iniciadores testados neste trabalho são provenientes da coleção da University of British Columbia - Nucleic Acid - Protein Service Unit (Canadá), e estão especificados no Quadro 1.

Quadro 1. Oligonucleotídeos iniciadores decâmeros da coleção da "University of British Columbia", contendo os números de acesso à coleção bem como as respectivas seqüências de nucleotídeos utilizados para construção da matriz de similaridade neste trabalho

*202. GAG CAC TTA C	*225. CGA CTC ACA G	*251. CTT GAC GGG G	*278. GGT TCC AGC T
*203. CAC GGC GAG T	*227. CTA GAG GTC C	*252. CTG GTG ATG T	*279. AGA CAT TAG A
*204. TTC GGG CCG T	*228. GCT GGG CCG A	*254. CGC CCC CAT T	*280. CTG GGA GTG G
*205. CGG TTT GGA A	*230. CGT CGC CCA T	*258. CAG GAT ACC A	*281. GAG AGT GGA A
*206. GAG GAC GTC C	*233. CTA TGC GCG C	*260. TCT CAG CTA C	*282. GGG AAA GCA G
*207. CAT ATC AGG G	*234. TCC ACG GAC G	*262. CGC CCC CAG T	*283. CGG CCA CCG T
*209. TGC ACT GGA G	*237. CGA CCA GAG C	*266. CCA CTC ACC G	*285. GGG CGC CTA G
*211. GAA GCG CGA T	238. CTG TCC AGC A	*269. CCA GTT CGC C	*286. CGG AGC CGG C
*212. GCT GCG TGA C	*239. CTG AAG CGG A	*272. AGC GGG CCA A	*289. ATC AAG CTG C
*213. CAG CGA ACT A	*240. ATG TTC CAG G	*273. AAT GTC GCC A	*290. CCG CGA GAC C
*214. CAT GTC CTT G	*241. GCC CGA CGC G	*300. GGC TAG GGC G	*292. AAA CAG CCC G
*215. TCA CAC GTG C	*299. TGT CAG CGG T	*274. GGT CCC GAG T	*293. TCG TGT TGC T
*222. AAG CCT CCC C	*250. CGA CAG TCC C	*275. CCG GGC AAG C	*210. GCA CCG AGA G
*224. TCT CCG GTA T			

As reações de amplificação foram conduzidas em um volume de 20 μ L contendo: 20 ng de DNA, 0,5 μ L de solução de dNTPs 10 mM; 0,6 μ L de

MgCl₂ 50 mM; 3,0 μ L de solução de iniciadores 10 pmol μ L⁻¹; 2,0 U da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen®); 2,0 μ L solução tampão 10X, 1,5 μ L de

solução Tampão B e água Milli-Q® (q.s.p. 20 µL).

O programa de amplificação para os indicadores RAPD foi realizado em termociclador modelo TGradiente (Biometra®) da seguinte forma: um passo inicial de desnaturação de 5 min a 95° C, seguido de 45 ciclos com desnaturação a 95° C por 1 min; pareamento a 37° C por 1 min e extensão a 72° C por 2 min. Ao final dos 45 ciclos foi realizada uma extensão extra a 72°C por 8 min, seguida de manutenção da temperatura de 4°C.

Após as amplificações, 15 µL de cada amostra foram misturados a 5 µL de tampão de carregamento (azul bromofenol a 0,5 % em glicerol 50%) e aplicados em géis de agarose 1,5% em tampão de corrida TEB (Tris 89 mM, EDTA 2,5 mM, ácido bórico 89 mM), corado com brometo de etídeo (0,5 mg mL⁻¹) (SAMBROOCK *et al.*, 1989). Para referência de migração eletroforética foi utilizado o marcador de tamanho molecular 1 kb DNA ladder (Fermentas®).

Para análise dos dados, foi confeccionada uma planilha, correlacionando os dados relativos à presença ou ausência de bandas. Esta planilha foi utilizada na construção de uma matriz de similaridade genética (Tabela 1) e de um filograma pelo software Freetree® (versão 0.9.1.50), utilizando o agrupamento neighbor joining e o coeficiente de Jaccard, sendo sua

visualização possibilitada com o auxílio do software Treeview®.

RESULTADOS

Apesar da baixa concentração de DNA de cada amostra, a extração pelo kit InstaGene Matrix® foi eficiente em sua função, além de ser um método mais rápido e simples em relação as técnicas tradicionais de extração (MARMUR e DOTY, 1961).

Foram testados 53 iniciadores, dos quais apenas 19 apresentaram amplificação das amostras de forma efetiva e 12 destes estão descritos na Tabela 1, evidenciando o número de bandas e a porcentagem de polimorfismo encontrado para as duas cepas de *F. columnare*. Alguns dos resultados da análise da variabilidade genética realizada com as duas amostras de DNA de *F. columnare* e a de *E. coli* estão ilustrados na Figura 1. Pode-se observar, através dos vários perfis apresentados, que houve amplificação de muitas bandas polimórficas. Alguns iniciadores, como o 255 (Figura 1b), o 230 (Figura 1c), entre outros, amplificaram grande número de fragmentos, enquanto outros, como o 232 (Figura 1a), amplificaram um pequeno número de fragmentos.

Tabela 1. Número de bandas amplificadas por iniciador decâmero para as cepas de *Flavobacterium columnare* (F1 e F2) e *E. coli* (Ec) e porcentagem de polimorfismos, calculada em relação a F1 e F2, F1 e Ec, e F2 e Ec, para cada um dos iniciadores

Iniciador	Número de bandas amplificadas			Porcentagem de polimorfismo (%)		
	F1	F2	Ec	F1/F2	F1/Ec	F2/Ec
243	1	3	4	50	60	71,4
210	1	4	4	60	60	50
252	1	3	1	100	100	50
232	3	3	2	33,3	60	60
245	5	6	6	9,1	0	8,3
249	1	4	3	100	100	100
204	3	3	4	66,6	71,4	14,3
228	5	4	5	55,5	60	33,3
211	4	5	3	33,3	14,3	25
230	4	3	4	71,4	50	42,8
269	1	3	1	100	0	50
282	1	1	5	100	66,6	66,6

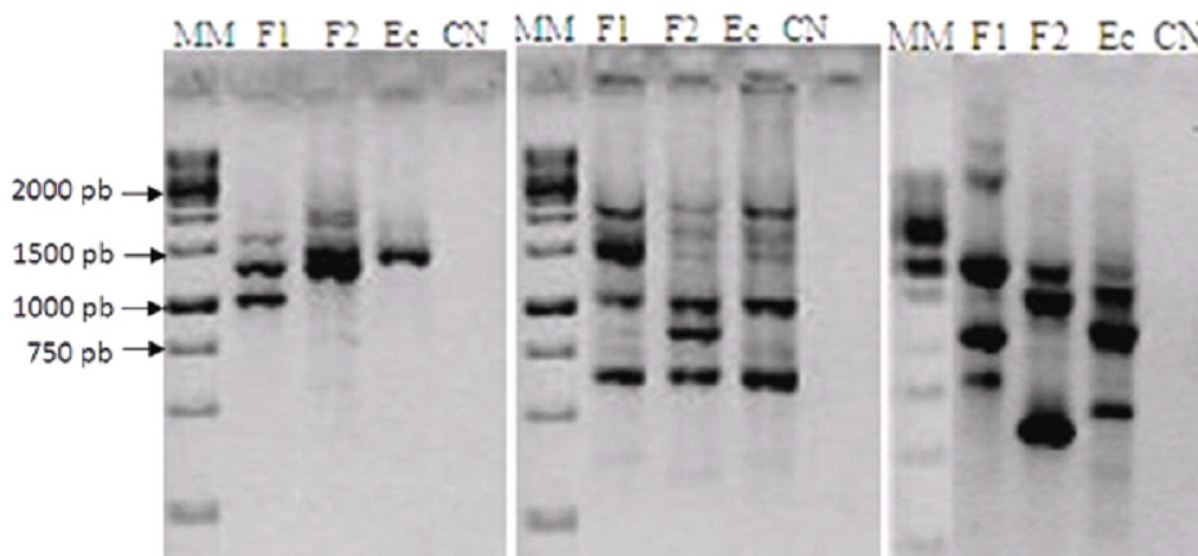


Figura 1. Perfis de RAPD dos materiais genéticos amplificados com a utilização dos iniciadores 232 (a), 245 (b), 230 (c). MM: marcador de tamanho molecular 1kb DNA ladder; F1 e F2: isolados de *Flavobacterium columnare*; Ec: cepa de *E. coli* DH5 α . CN: controle negativo

A partir da análise dos géis, foram obtidas 150 bandas polimórficas para a montagem da planilha de similaridade (Tabela 2) e do filograma (Figura 2). Vários iniciadores, não ilustrados no trabalho, não apresentaram nenhuma amplificação de bandas, provavelmente por não existir região para o pareamento das bases ao longo do genoma desses isolados.

A análise de similaridade genética e o filograma obtido permitiram o agrupamento dos biótipos de forma tanto mais similares quanto mais coincidentes fossem os fragmentos de mesmo peso molecular amplificados, permitindo as análises de distância genética entre os isolados. Além disso, para a maior confiança dos resultados, por meio do software Treeview®, gerou-se um bootstrapping de 1000 vezes.

Os resultados descritos na Tabela 2 mostram que a F1 é 77,6% similar à F2 e 76,1% similar a *E. coli*, enquanto que a F2 é 70,2% similar à *E. coli*. Desse modo, o filograma agrupou as cepas de *F. columnare* em um único grupo, separando-as da *E. coli*.

Os números da Figura 2 indicaram que, das 1000 vezes que o programa analisou os dados, 100 vezes a *E. coli* diferiu dos isolados de *F. columnare*, e 33 vezes agrupou os isolados F1 e F2.

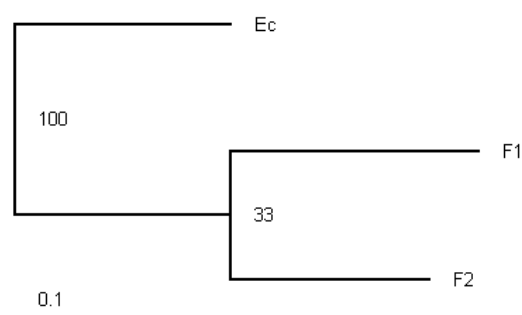


Figura 2. Filograma obtido através da análise de RAPD-PCR a partir de DNA de isolados de *Flavobacterium columnare* (F1 e F2) e *E. coli* (Ec)

Tabela 2. Matriz de similaridade genética em porcentagem (%) entre os isolados de *Flavobacterium columnare* (F1 e F2) e *E. coli* (Ec) microrganismo utilizado como controle negativo neste estudo

	F1	F2	Ec
F1	100		
F2	77,6	100	
Ec	76,0	70,1	100

DISCUSSÃO

A técnica de RAPD-PCR mostrou-se eficaz na caracterização das cepas de *F. columnare* avaliadas. Porém, como relatado em outros trabalhos, alguns

fatores podem interferir no sucesso da execução da técnica.

Esses fatores são a reduzida faixa de hibridização, levando a baixa reprodutibilidade; contaminação por DNA exógeno, resultado da não especificidade dos iniciadores; concentração do MgCl₂ e temperatura média de pareamento dos oligonucleotídeos iniciadores ao DNA molde (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1996; PALUMBI, 1996; MARQUES, 2003).

Em vista disto, após a otimização das reações de PCR e visualização das bandas de RAPD, as mesmas reações eram repetidas por mais três vezes para se garantir que a posição em relação ao marcador de tamanho molecular fosse a mesma.

FARMER (2004) utilizou RAPD-PCR para caracterização de 48 cepas de *F. columnare* isoladas de diferentes regiões dos Estados Unidos (Louisiana, Texas, Minnesota, Florida), a partir de espécies distintas de peixes (tilápia, bagre, truta arco-íris, entre outras), durante as diversas estações do ano, e devido ao maior número de amostragens, conseguiu detectar três grupos, evidenciando a variabilidade genética existente nas cepas avaliadas.

Este trabalho, utilizando-se de uma pequena amostragem, tentou reproduzir a técnica para cepas de *F. columnare* e hospedeiros de clima tropical, mostrando que é possível esta caracterização, encontrando similaridade genética (77,6%).

Estes dados estão de acordo com a caracterização bioquímica feita anteriormente por PILARSKI *et al.*, 2008, e caracterização molecular por PCR-RFLP (Polymerase chain reaction - Restriction fragment length polymorphism) do gene 16S rDNA dos isolados F1 e F2 realizada por SEBASTIÃO *et al.*, 2010.

A técnica de RAPD-PCR veio confirmar os resultados de outras metodologias, mostrando-se mais rápida e precisa que apenas a caracterização bioquímica, a qual pode levar até 7 dias para ser executada e resultar em respostas inconclusivas em relação a definição de espécies.

Além disso, RAPD-PCR apresenta-se de quatro a seis vezes mais eficiente que a técnica de RFLP, por exemplo, no mapeamento de polimorfismo ligados a locos de resistência a doenças, e 10 vezes

mais eficiente em tempo e mão de obra, pois permite a detecção do perfil genético pela visualização direta dos fragmentos no gel, eliminando as etapas de transferência de DNA para membranas, hibridização com sondas e autoradiografia (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1996).

CONCLUSÕES

A técnica de RAPD-PCR permitiu a caracterização do perfil genético dos isolados de *F. columnare* estudados com base nos oligonucleotídeos utilizados, podendo-se verificar, aliado a outras técnicas, alta similaridade entre os isolados de uma mesma espécie bacteriana, confirmando ser um método molecular de diagnóstico da columnariose. Portanto, o trabalho contribui para a ampliação das opções em laboratórios de diagnóstico de patologia de peixes utilizarem, de acordo com a tecnologia e recursos de que dispuserem.

REFERÊNCIAS

- ARIAS, C.R.; WELKER, T.L.; SHOEMAKER, C.A.; ABERNATHY, J.W.; KLESIUS, P.H. 2004 Genetic fingerprinting of *Flavobacterium columnare* isolates from cultured fish. *Journal of Applied Microbiology*, Auburn, 97: 421-428.
- CARLSON, R.V. e PACHA, R.E. 1968 Procedure for the isolation and enumeration of myxobacteria from aquatic habitats. *Applied Microbiology*, Corvallis, 16: 795-796.
- DARWISH, A.M. e ISMAIEL, A.A. 2005 Genetic diversity of *Flavobacterium columnare* examined by restriction fragment length polymorphism and sequencing of the 16S ribosomal RNA gene and the 16S-23S rDNA spacer. *Molecular Cell Probes*, Stuttgart, 19: 267-274.
- DURBOROW, R.M.; THUNE, R.L.; HAWKE, J. P.; CAMUS, A.C. 1998 Columnaris Disease: A bacterial infection caused by *Flavobacterium columnare*. *Southern Regional Aquaculture Center*, Frankfort, 479: 1-4.
- FARMER, B. 2004 *Improved methods for the isolation and characterization of Flavobacterium columnare*. Northwestern State University, 62p. (Dissertação de Mestrado em Ciências.

- Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College).
- FERREIRA, M.E. e GRATTAPAGLIA, D. 1996 *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 2ª edição. Embrapa, Brasília-DF. 220 p.
- FIGUEIREDO, H.C.P.; KLESIOUS, P.H.; ARIAS, C.R.; EVANS, J.; SHOEMAKER, C.A.; PEREIRA Jr, D.J.; PEIXOTO, M.T.D. 2005 Isolation and characterization of strains of *Flavobacterium columnare* from Brazil. *Journal of Fish Diseases*, Auburn, 28: 199-204.
- FLEMMING, L.; RAWLINGS, D.; CHENIA, H. 2007 Phenotypic and molecular characterization of fish-borne *Flavobacterium johnsoniae*-like isolates from aquaculture systems in South Africa. *Research in Microbiology*, Matieland, 158: 18-30.
- HAHN, N.S.; AGOSTINHO, A.A.; GOITEIN, R. 1997 Feeding ecology of curvina *Plagioscion squamosissimus* (Heckel, 1840) (Osteichthyes, Perciformes) in the Itaipu Reservoir and Porto Rico floodplain. *Acta Limnologica Brasiliensia*, Maringá, 9(1): 11-22.
- KUNTU, H.M.T.; VALTONEN, E.T.; SUOMALAINEN, L-R.; VIELMA, J.; JOKINEN, I.E. 2009 The efficacy of two immunostimulants against *Flavobacterium columnare* infection in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & Shellfish Immunology*, Jyväskylä, 26(6): 850-857.
- MARENGONI, N.Z., 2006 Produção de tilápia do nilo *Oreochromis niloticus* (linhagem chitralada), cultivada em tanques-rede, sob diferentes densidades de estocagem. *Revista Archivos de Zootecnia*, Marechal Cândido Rondon, 55: 127-138.
- MARMUR, J. e DOTY, P. 1961 Thermal renaturation of deoxyribonucleic acids. *Journal of Molecular Biology*, Massachusetts, 3: 585-594.
- MARQUES, E.K. 2003 *Diagnóstico Genético-Molecular*. Ed. ULBRA, Canoas. 372 p.
- MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA (MPA). 2009 *Produção pesqueira e aquícola. Estatística 2008 e 2009*. Brasília, DF. 30p.
- PALUMBI, S.R. 1996 *Nucleic Acids II: The Polymerase Chain Reaction*. In: HILLIS, D.M.; MORITZ, C.; MABLE, B.K. *Molecular Systematics*. Sinauer Associates, Massachusetts. p.205-247.
- PILARSKI, F.; ROSSINI, A.J.; CECCARELLI, P.S. 2008 Isolation and characterization of *Flavobacterium columnare* (Bernardet et al. 2002) from four tropical fish species in Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, Pirassununga, 68: 631-637.
- POWELL, D.B.; PALM JR., R.C.; MACKENZIE, A.P.; WINTON, J.R. 2009 Extremophile extracts and enhancement techniques show promise for the development of a live vaccine against *Flavobacterium columnare*. *Cryobiology*, Redmond, 59: 158-163.
- SAMBROOCK, J.; MINIATIS, T.; FRITSH, E.F. 1989 *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2ª ed. New York: Cold Spring Harbor. 250 p.
- SEBASTIÃO, F.A.; PILARSKI, F.; LEMOS, M.V.F. 2010 Isolation and molecular characterization of *Flavobacterium columnare* strains from fish in Brazil. *Journal of Bacteriology Research*, Jaboticabal, 2: 22-29.
- SHOEMAKER, C.A.; OLIVARES-FUSTER, O.; ARIAS, C.R.; KLESIOUS, P.H. 2008 *Flavobacterium columnare* genomovar influences, mortality in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Journal of Veterinary Microbiology*, Auburn, 127: 353-9.
- SUOMALAINEN, L.R.; BANDILLA, M.; VALTONEN, E.T. 2009 Immunostimulants in prevention of columnaris disease of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, Jyväskylä, 32: 723-726.
- WILLIAMS, J.G.K.; HANAFEY, M.K.; RAFALSK, J.A.; TINGEY, S.V. 1993 Genetic analysis using RAPD markers. *Methods in Enzymology*, San Diego, 218: 704-40.
- ZIMMERMANN, S. e HASPER, T.O.B., 2003 *Piscicultura no Brasil: o processo de intensificação da tilapicultura*. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 40., Santa Maria, 21-24/jul./2003. *Anais... SBZ*. CD ROOM.