



Revista MVZ Córdoba

ISSN: 0122-0268

editormvzcordoba@gmail.com

Universidad de Córdoba

Colombia

Altamiranda M, José; Salazar V, Marcela; Briñez R, Boris
Presencia de *Spiroplasma penaei* en plancton, bentos y fauna acompañante en fincas camaroneras
de Colombia
Revista MVZ Córdoba, vol. 16, núm. 2, mayo-agosto, 2011, pp. 2576-2583
Universidad de Córdoba
Montería, Colombia

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=69322446016>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica
Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Presencia de *Spiroplasma penaei* en plancton, bentos y fauna acompañante en fincas camaroneras de Colombia

Presence of *Spiroplasma penaei* in plankton, benthos and fauna in shrimps farms of Colombia

José Altamiranda M,¹ Acuicultor, Marcela Salazar V,¹ M.D, Boris Briñez R,^{1,2*} M.Sc.

¹Centro de Investigaciones para la Acuicultura de Colombia (Ceniagua), Cra 9 C No. 114 – 60, Bogotá, Colombia. ²Universidad Estatal de Campinas – UNICAMP, Departamento de Genética, Evolución y Bioagentes. Instituto de Biología, Brazil. Correspondencia: *borisbrinez@hotmail.com.

Recibido: Junio de 2010; Aceptado: Febrero de 2011.

RESUMEN

Objetivo. Determinar la presencia de *Spiroplasma penaei* en el plancton, bentos y fauna acompañante en 2 fincas comerciales de camarones. **Materiales y métodos.** Fueron colectadas 200 muestras para identificación de lesiones características de *Spiroplasma*, a través de la técnica de histología, mientras que para la técnica de PCR se tomaron 326 muestras de plancton, bentos y fauna acompañante. Las muestras colectadas fueron preservadas en tubos estériles con etanol al 95% para análisis de PCR y en solución Davidson para análisis histológicos. **Resultados.** En los muestreos realizados en las dos fincas camaroneras fue detectada la presencia de *Spiroplasma* en una muestra de un representante de los dípteros (mosca de agua) a través de la técnica de PCR en tiempo real, el cual arrojó una $T_m=84$, similar a la del control positivo de *Spiroplasma* utilizado. Esta muestra fue secuenciada y comparada con secuencias de bacterias almacenadas en el banco de datos GenBank usando el algoritmo BLAST, encontrando 100% de homología con un fragmento de los genes ribosomales 16S de la bacteria *Spiroplasma penaei*. **Conclusiones.** La mosca de agua es portadora de *Spiroplasma penaei*, sin embargo no se puede afirmar que este organismo sea el transmisor de la infección, por lo que se recomienda realizar ensayos de tipo experimental con moscas de agua infectadas con *Spiroplasma penaei*, en camarones libres de patógenos, para evaluar si en realidad es el vector de infección.

Palabras clave: Bentos, PCR, *Penaeus vannamei*, plácton, *Spiroplasma*. (Fuente: AIMS).

ABSTRACT

Objective. To determine the presence of *Spiroplasma penaei* on plankton, benthos and fauna samples, in two commercial shrimp farms. **Material and methods.** A total of 526 samples of plankton, benthos and fauna were collected; 200 samples were used for histological examination to identify the typical lesions of *Spiroplasma*, and 326 samples were used for PCR. The samples collected were kept in sterile tubes and preserved in Davidson solution for histological analyses and in 95% ethanol solution for PCR. **Results.** The presence of *Spiroplasma* was detected in a water fly through the technique of real time PCR with a melting temperature $T_m=84$, similar to the positive control used. This sample was sequenced and compared with sequences of bacteria stored in the GenBank database using the BLAST algorithm, founding 100% homology with a fragment of the 16S ribosomal genes of the bacterium *Spiroplasma penaei*. **Conclusions.** The water fly can carry the *Spiroplasma penaei*, however more experimental assays are required, using water flies infected with *Spiroplasma penaei* and pathogen-free shrimp to prove this findings.

Key words: Benthos, PCR, *Penaeus vannamei*, plankton, *Spiroplasma*. (Source: AIMS).

INTRODUCCIÓN

En el comercio internacional el producto acuícola de mayor importancia es el camarón marino. Aproximadamente el 26% del producto total proviene de las especies de *Peneidos* criados en estanques (1), siendo el predominante el *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*, por lo que la industria camaronera colombiana es generadora de importantes divisas para el país a través de las exportaciones de camarones cultivados (2).

El cultivo de estos animales en estanques a altas densidades conlleva a situaciones de enfermedad por confinamiento (3). Por lo general las enfermedades más severas del camarón son causadas por virus y bacterias, ocasionando de este modo grandes pérdidas económicas a los cultivadores (4).

La causa de las enfermedades bacterianas está relacionada con el tipo de manejo que se aplique y a las condiciones medioambientales presentes. En sistemas semi-intensivo e intensivo, el incremento de la densidad de cultivo, las heces y el recambio inapropiado de agua, hacen susceptibles a los peneidos para que sean atacados por bacterias (5).

Dentro del grupo de las bacterias que afectan el monocultivo de camarón encontramos al

Spiroplasma. La mayoría de las especies de *Spiroplasma* son naturalmente patógenos de plantas y artrópodos, principalmente insectos (6-7), la cual se ha aislado de la hemolinfa de los mismos (6).

La detección de *Spiroplasma* en crustáceos es relativamente nueva. El primer reporte de este patógeno fue hecho por Wang et al (7-8) quienes demostraron la presencia de este patógeno en el cangrejo *Eriocheir sinensis*, el cual causa la enfermedad de "tremor" (7). Wang y Gu (9) encontraron que esta enfermedad se presenta en temperaturas relativamente altas (28°C) y las principales sintomatologías son debilitamiento, anorexia y muerte. En el mismo año Zbinden y Cambon-Bonavita (10) reportaron *Spiroplasma* en el camarón *Rimicaris exoculata*. Mortalidades atípicas y severas aparecieron en una finca camaronera colombiana localizada en la costa Atlántica. Durante los meses siguientes estanques adicionales experimentaron altas mortalidades, donde la sobrevivencia fue de 40%. El diagnóstico presuntivo para las mortalidades sufridas fue atribuido a una infección bacteriana severa. Este fue confirmado a través de la hibridación *in situ* y bioensayos. La infección fue causada por una nueva especie del género *Spiroplasma*, denominada *S. Penaei*. Esta especie de *Spiroplasma* es considerada como el agente

causal del "síndrome del muerto parado", el cual ocasiona patologías como: tracto digestivo vacío, nado errático y producción de gas en el cefalotórax, lo que origina una flotación vertical anormal del animal (11). El último reporte acerca de este género fue realizado por Wang et al (12), catalogándolo como causante de patologías en la langosta de agua dulce *Procambarus clarkii*, el cual produjo severas mortalidades estimadas entre 92 y 96% en el sudeste de China. De este mismo modo Nunan et al (13) reportaron mortalidades en cultivo de camarón *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* en piscinas que presentaban valores de salinidad bajos y altas temperaturas

Spiroplasma es una bacteria gram positiva que por estar asociada con artrópodos, principalmente insectos (6), es probable que estos animales sean los transmisores de esta enfermedad en camarones teniendo en cuenta que la dieta de estos es omnívora (14-15).

Debido a que en la columna de agua y sobre la superficie de las piscinas camaroneras se encuentra además de plancton y bentos, una gran variedad de insectos, es posible que estos estén actuando como vectores de infección, por lo que el objetivo de este trabajo fue la identificación de los vectores de *Spiroplasma*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio. El estudio fue realizado en dos fincas camaroneras ubicadas en el municipio de San Antero, en el norte del departamento de Córdoba, Colombia, a 5 metros sobre el nivel del mar y cuyas coordenadas geográficas son 09° 23' de latitud Norte y 75° 46' de longitud oeste de Greenwich con temperatura promedio de 28°C.

Toma de muestras. Fueron muestreadas piscinas que presentaron antecedentes de *Spiroplasma*, y dos piscinas control en cada finca. Se tomaron muestras de plancton, bentos y fauna acompañante cada 15 días durante dos ciclos de cultivo (240 días). Las muestras colectadas fueron colocadas en

tubos eppendorf estériles con etanol al 95% para análisis de PCR y se fijaron camarones con solución Davidson para histopatología. También se tomaron muestras de plancton y fauna acompañante del manglar y del canal de entrada que surte de agua a las piscinas.

Identificación de las muestras. Las muestras de plancton fueron montadas al microscopio con el fin de identificar los organismos hasta el nivel taxonómico más bajo posible. Las muestras de bentos, fauna acompañante e insectos, fueron observadas individualmente al estereoscopio para su identificación. Parte de las muestras fueron enviadas al laboratorio de biología molecular, para la extracción del ADN y respectiva amplificación con los iniciadores específicos para *Spiroplasma*.

Extracción y amplificación de ADN. El ADN extraído y la PCR fueron realizados conforme a lo propuesto por Nunan et al (11). El fragmento fue amplificado por el par de primers CSF: 5' TAG CCG AAC TGAGAG GTT GA 3' y CSR 5' GAT AAC GCT TGC CACCTA TG 3' con 520 pares de bases aproximadamente. El volumen de la reacción de PCR fue de 25 µl, conteniendo Tris-KCl (20 mM Tris-HCl pH 8.4 con 50 mM KCl), 2.0 mM MgCl₂, 2.5 µM de cada primer, 0.1 mM de cada dNTP, 2.5 U de Taq DNA polimerasa, 15 ng de ADN e agua Milli-Q para completar el volumen a 25 µL el mix fue colocado en termociclador y el DNA desnaturado a 94°C por 5 minutos. La amplificación fue en 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, seguido de una extensión final de 72°C por 4 minutos.

El ADN de las muestras que presentaron fragmentos amplificados de tamaño similar al control positivo de *Spiroplasma* fueron amplificadas por PCR en tiempo real en un termociclador Opticon (MJ Research, Hatboro, USA). Como fluorómetro se empleó Sybr Green el cual se une a la hebra de ADN de doble cadena y emite fluorescencia a una longitud de onda de 530nm. Fueron realizados análisis de las curvas de disociación para verificar la especificidad del producto amplificado.

Secuenciamento. Las muestras que mostraron curvas de disociación similares al del control positivo del *Spiroplasma* fueron secuenciadas en un secuenciador automático MegaBace (Amersham) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, utilizando el primer CSF: 5' TAG CCG AAC TGAGAG GTT GA 3'. Las secuencias obtenidas fueron alineadas utilizando el programa CLUSTAL W (16) y editadas manualmente con el programa BIOEDIT (17). Estas secuencias fueron comparadas con las bases de datos públicas, usando la herramienta Blast2-NCBI (18).

Histología. Los camarones y poliquetos respectivamente fijados en solución Davidson, fueron remitidos al laboratorio de histología de CENIACUA en Cartagena, en donde fueron realizados micropreparados coloreados con eosina y hematoxilina según el protocolo estandarizado por CENIACUA.

RESULTADOS

Reacción en cadena de la polimerasa.

Un total de 326 muestras fueron analizadas por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Fue detectada la presencia de *Spiroplasma* en: 4 muestras de músculo de camarón, 1 muestra de plancton y en 10 de insectos (mosca de agua, *Hesperocorixa*, *Uca*, *Callinectes sapidus*, *Orthoptera* sp1 y *Lepidoptera* sp2). Los camarones que fueron positivos por PCR también presentaron las lesiones típicas de espiroplasma por histopatología (Figura 1).

Las muestras de plancton, bentos, fauna acompañante e insectos de los muestreos realizados durante los dos ciclos de cultivo, usando iniciadores específicos de 16S de rRNA de *Spiroplasma* mostró la presencia de la bacteria en las muestras de *Hesperocorixa*, mosca de agua perteneciente al orden Díptera, representantes del orden Lepidoptera (sp2) y representantes del orden Orthoptera (sp1). Resultados no detectables fueron encontrados en las muestras de *Upogebia* y *Uca*.

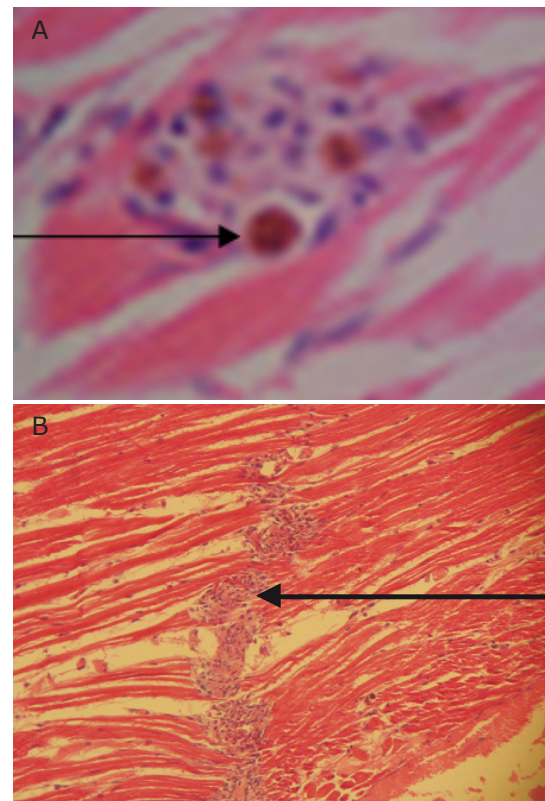


Figura 1. Corte transversal del músculo de un camarón con lesiones típicas de *Spiroplasma*: A (la flecha indica cuerpos eosinófilos en el músculo), B (la flecha indica infiltración en el músculo).

PCR en tiempo real. Los resultados positivos por PCR fueron procesados a través de PCR en tiempo real. El organismo en el que se observó presencia de *Spiroplasma* por PCR en tiempo real fue la mosca de agua con una $T_m = 84$, similar a la del control positivo de *Spiroplasma* utilizado (Figura 2). Esta muestra fue secuenciada para verificar la presencia de esta especie de bacteria.

Secuenciación – Blast. En este estudio sólo se procesaron las muestras de la mosca de agua puesto que fue la única que resultó positiva a través de PCR en tiempo real. Esta muestra fue comparada con secuencias de bacterias pertenecientes al GenBank usando el algoritmo BLAST, encontrando 100% de homología con un fragmento de los genes ribosomales 16S de la bacteria *Spiroplasma penaei*.

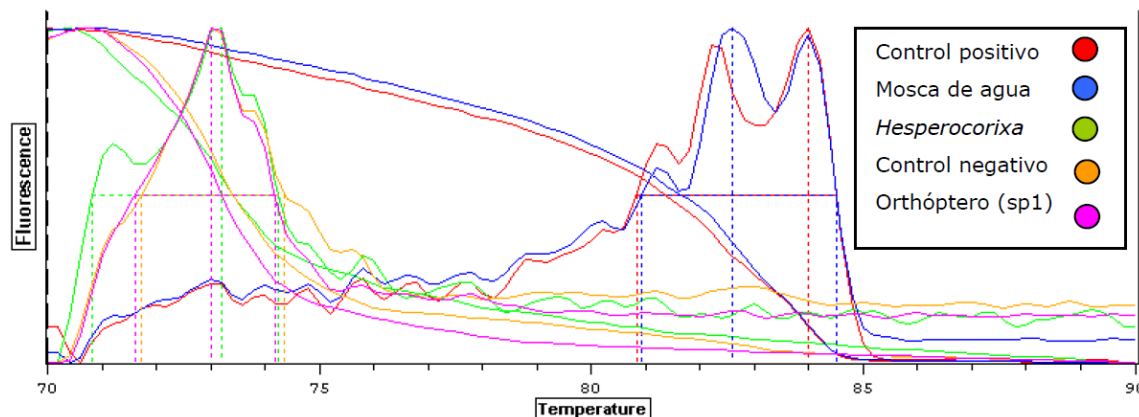


Figura 2. Curva de disociación de las muestras en las que se detectó *Spiroplasma*, a través de PCR. La mosca de agua (color azul) es un resultado que coincide con el control positivo de *Spiroplasma* (color rojo), con una $T_m = 84$; mientras que *Hesperocorixa* (color verde) y el *orthóptero* sp1 (color fucsia) son resultados que coinciden con el control negativo de *Spiroplasma* (color naranja), con una $T_m = 73$.

DISCUSIÓN

Las piscinas comenzaron a presentar mortalidades en la época de lluvia, momento en el cual la salinidad bajó considerablemente en el primer ciclo de 27.6 ± 0.86 UPS hasta 16 y 17 UPS en todas las piscinas, además para este periodo la temperatura en las horas de la tarde no bajó de los 30.8°C , mientras que en el segundo periodo la salinidad llegó a bajar hasta 11 UPS y la temperatura no bajó de 31.7°C en las horas de la tarde, lo que coincide con lo reportado por Wang y Gu (9), quienes encontraron mortalidades hasta del 90% en cultivo del cangrejo de agua dulce *Eriocheir sinensi*, con temperaturas relativamente altas, al igual que lo reportado por Wang et al (12) quienes detectaron la presencia de *Spiroplasma* en la langosta de agua dulce *Procambarus clarkii*, en periodo de verano, donde las temperaturas son elevadas. De este mismo modo Nunan et al (13) reportaron mortalidades en cultivo de camarón *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* en piscinas que presentaban valores de salinidad bajos y altas temperaturas.

En las fincas muestreadas los valores de temperatura variaron entre $28.9 \pm 1.36^\circ\text{C}$ y $35.1 \pm 0.94^\circ\text{C}$, observándose altos valores en los meses de junio y julio, mientras que los valores de salinidad variaron entre 21.0 ± 1.73 UPS y 29.5 ± 0.50 UPS. Los

valores más bajos se observaron en el mes de junio y julio. En el mes de julio se presentaron mortalidades ocasionadas por *Spiroplasma*, lo que confirma que esta bacteria se encuentra presente en aguas de baja salinidad con elevadas temperaturas.

En los muestreos realizados se detectó la presencia de *Spiroplasma* en el (4.6%) de las muestras procesadas, dentro de estos sobresalieron los insectos pertenecientes al orden Orthóptera, Lepidóptera, especies del género *Hesperocorixa* y un representante de los Dípteros (mosca de agua). *Hesperocorixa* fue positivo por PCR en todas las piscinas muestreadas, al igual que las moscas de agua. En todas las piscinas muestreadas se detectó *Spiroplasma* por PCR en las muestras de músculo de camarón *Litopenaeus vannamei*.

CENIACUA en muestreos realizados en años anteriores detectó *Spiroplasma* en muestras de callianassa; sin embargo en el presente estudio en ningún momento se encontraron callianassas sintomáticas y no se detectó la presencia de la bacteria por las técnicas de histología y PCR, por lo que se descarta la posibilidad de que las callianassas sean vectores de infección.

Aunque se piensa que el manglar de algún modo influye con la incidencia de la bacteria, dado que las primeras piscinas en presentar síntomas de la enfermedad son las cercanas a este, no se pudo detectar la presencia de *Spiroplasma* al igual que en el canal reservorio; sin embargo no se descarta la posibilidad de que la bacteria está asociada al manglar.

La PCR de bacterias utilizando iniciadores de genes 16S pueden presentar coamplificación con otros géneros como *Micoplasma hominis* y *Micoplasma mycoides* que poseen homología con la secuencia de *Spiroplasma* en algunos pares de bases Gasparich et al (19). Además, debido a la elevada sensibilidad del método, el riesgo de contaminación es considerable, por lo que existe la posibilidad de obtener resultados falsos positivos (20). Por esto es necesario procesar los resultados positivos a través de PCR en tiempo real, debido a que por medio de esta técnica además de cuantificar la cantidad de ADN amplificado, se puede evaluar la especificidad al calcular la fluorescencia versus temperatura en una curva de disociación. Estas curvas dan lugar a la temperatura de disociación (T_m) que depende sobre todo de la composición de las bases y de la longitud de la secuencia amplificada, pudiéndose diferenciar la secuencia blanco de otras secuencias amplificadas como dímeros de iniciadores que se disocian a menores temperaturas (21-22).

El organismo en el que se observó presencia de *Spiroplasma* por PCR en tiempo real fue la mosca de agua. A pesar que *Hesperocorixa* y el representante del orden orthóptera (sp1) arrojaron resultados positivos por PCR, no se pudo comprobar que estos eran portadores de la bacteria por PCR en tiempo real. Otro aspecto a tomar en cuenta es el hecho de que los primers están diseñados para secuencias del género *Spiroplasma* a partir de una región 16S, por lo que no se puede asegurar que el *Spiroplasma* detectado en la mosca de agua, sea el mismo que afecta a los camarones de cultivo. Por tal razón fue necesario secuenciar esta muestra para verificar la presencia de esta especie de bacteria.

Al comparar esta muestra con secuencias de bacterias pertenecientes al GenBank usando el algoritmo BLAST, se encontró 100% de homología con un fragmento de los genes ribosomales 16S de la bacteria *Spiroplasma penaei*, acceso gb|AY771927.1.

A través de este método se comprobó que la mosca de agua es portadora de *S. penaei*; sin embargo no se puede afirmar que este organismo sea el vector de la infección, puesto que para comprobarlo se sugiere realizar ensayos experimentales con moscas de agua infectadas con *Spiroplasma penaei* en camarones libres de patógenos, y así determinar si son transmisores de la enfermedad.

El género *Spiroplasma* se ha logrado aislar de varias especies de plantas y de insectos pertenecientes a los órdenes Díptera, Himenóptera, Coleóptera, Lepidóptera, Homóptera y Hemíptera (6-23-24). Fletcher et al (23) reportaron a los insectos *Circulifer tenellus*, *Circulifer hematocephus* y *Circulifer opacipennis* como vectores de infección de *S. citri* en árboles cítricos; mientras que Tsai (25) encontró que *S. kunkelli*, patógeno del maíz es transmitido a través del género *Dalbulus*. En general los insectos son infectados con *Spiroplasma* a través del polen de la flor, causando de este modo grandes pérdidas económicas a más de 300 especies de plantas agrícolaemente importantes (26).

Como conclusión, se plantea la probabilidad de que la mosca de agua sea el vector de infección de *S. penaei* en camarones, teniendo en cuenta que el camarón es omnívoro (14-15) y que la mayoría de los vectores de *Spiroplasma* son los insectos (6-23-24). Como los organismos involucrados con *Spiroplasma* fueron los insectos, se hace recomendable evaluar las muestras pertenecientes a este grupo con bioensayos *ex situ*. Además de tomar ciertas medidas de bioseguridad en las fincas tales como limpiar la maleza que se encuentra en el terraplén y alrededor de las piscinas, para destruir el hábitat de organismos indeseables en el ciclo de cultivo de camarón.

REFERENCES

1. FAO (Food & Agriculture Organization of the United Nations) (2002). The State of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA). Rome: FAO. Kautsky N, Ronnback P, Tedengren M, Troell M. Ecosystem perspectives on management of disease in shrimp pond farming. *Aquaculture* 2000; 191:145-161.
2. Rosemberry B. World shrimp farming. Annual Report Shrimp News International. San Diego: World Aquaculture Society; 2001.
3. Kautsky N, Ronnback P, Tedengren M, Troell M. Ecosystem perspectives on management of disease in shrimp pond farming. *Aquaculture* 2000; 191:145-161.
4. Aguirre GG and Valle AF. Infectious disease in shrimp species with aquaculture potential. *Recent Res Dev Microbiol* 2000; 4:333-348.
5. Martin GG, Rubin N, Swanson E. *Vibrio parahaemolyticus* and *V. harveyi* cause detachment of the epithelium from the midgut trunk of the penaeid shrimp *Sicyonia ingenti*. *Dis Aquat Organ* 2004; 60: 21-29
6. Yokomi R, Mello AFS, Saponari M and Fletcher J. Polymerase chain reaction-based detection of *Spiroplasma citri* associated with citrus stubborn disease. *Plant Dis* 2008; 92:253-260.
7. Wang W, Rong L, Gu W, Du K, Chen J. Study on experimental infections of *Spiroplasma* from the Chinese mitten crab in crayfish, mice and embryonated chickens. *Res Microbiol* 2003; 154: 677-680.
8. Wang W, Chen J, Du K, Xu Z. Morphology of spiroplasmas in the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* associated with tremor disease. *Res Microbiol* 2004; 155:630-635.
9. Wang W, Gu ZF. Rickettsia-like organism associated with tremor disease and mortality of the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. *Dis Aquat Org* 2002; 48: 149-153.
10. Zbinden M, Cambon-Bonavita MA. Occurrence of Deferribacterales and Entomoplasmatales in the deep-sea alvinocarid shrimp *Rimicaris exoculata* gut. *FEMS Microbiol Ecol* 2003; 46: 23-30.
11. Nunan LM, Pantoja CR, Salazar M, Aranguren F, Lightner DV. Characterization and molecular methods for detection of a novel *Spiroplasma* pathogenic to *Penaeus vannamei*. *Dis Aquat Organ* 2004; 62: 255-264.
12. Wang W, Gu W, Ding Z, Ren Y, Chen J, Hou Y. A novel *Spiroplasma* pathogen causing systemic infection in the crayfish *Procambarus clarkii* (Crustacea: Decapod), in China. *FEMS Microbiol Lett* 2005; 249: 131-137.
13. Nunan LM, Lightner DV, Oduori MA, Gasparich GE. *Spiroplasma penaei* sp. nov., associated with mortalities in *Penaeus vannamei*, Pacific white shrimp. *Int J Syst Evol Microbiol* 2005; 55: 2317-2322.
14. Delgado JG, Poveda CM, Cahu C. Digestive enzyme activity and food ingesta in juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) as a function of body weight. *Aquac Res* 2003; 34:1403-1411
15. Otoshi CA, Montgomery AD, Look AM and Moss SM. Effects of diet and water source on the nursery production of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *J World Aquac Soc* 2001; 32: 243-249

16. Chena R, Sugawara H, Koike T, Lopez R, Gibson TJ, Higgins DG and Thompson JD. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res* 2003; 31: 3497-3500
17. Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 1999; 41: 95-98.
18. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990; 215: 403-10.
19. Gasparich GE, Whitcomb RF, Dodge D, French FE, Glass J, Williamson DL. The genus *Spiroplasma* and its nonhelical descendants: phylogenetic classification, correlation with phenotype and roots of the *Mycoplasma micoydes* clade. *Int J Syst Evol Microbiol* 2004; 54: 893-918.
20. Costa J. Real time PCR. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004; 22: 299-305.
21. Erali M and Wittwer C. High resolution melting analysis for gene scanning. *Methods* 2010; 50:250-261
22. Philip B and Wittwer C. Homogeneous amplification and variant detection by fluorescent hybridization probes. *Clin Chem* 2000; 46:147-148
23. Fletcher J, Melcher V, Wayadende A. The Phytopathogenic *Spiroplasmas*. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K, Stackebrandt E. *The Prokaryotes*. New York. Springer; 2006. p 905-947.
24. Barros TS, Davis RE, Resende RO. Design of polymerase chain reaction for specific detection of corn stunt *spiroplasma*. *Plant Diseases* 2001; 85: 475-480.
25. Seemüller E, Garnier M and Schneider B. Mycoplasmas of plants and insects. In: Razin S and Herrmann R. *Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers; 2002. p 91-115
26. Summers CG and Stapleton JJ. Management of corn leafhopper (Homoptera: Cicadellidae) and corn stunt disease in sweet corn using reflective mulch. *J Econ Entomol* 2002; 95:325-330