

安徽省克氏原螯虾白斑综合征病毒变异区序列分析

陈红莲, 王永杰*, 蒋业林, 程云生, 张 静, 王 芬

(安徽省农业科学院水产研究所, 合肥 230031)

摘 要: 白斑综合征已给安徽省克氏原螯虾产业带来了巨大的经济损失。为了解安徽省白斑综合征病毒 (white spot syndrome virus, WSSV) 分子流行病学, 2016 年 4—8 月在安徽省 6 个市采集 9 个养殖的克氏原螯虾样本进行 WSSV 套式 PCR 检测, 扩增病毒可变区 ORF94、ORF75 和 ORF125, 将获得序列进行比较分析。结果显示, 9 个样本均在第 1 轮 PCR 扩增中获得阳性结果, 其 ORF94 的重复单元 (repeat unit, RU) 数量为 2、4、7、8 和 12, 2 RUs 为常见基因型, ORF75 的组合 RUs 总数为 3、6、9、10 和 11, 9 RUs 为常见基因型, 排列顺序为 45、102、45、102、3×45、102 和 45, ORF125 的 RUs 为 5~9, 其中 7 RUs 和 6 RUs 为常见基因型。

关键词: 克氏原螯虾; 白斑综合征病毒; ORF94; ORF75; ORF125; 序列分析

中图分类号: S945.4

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2017)05-0784-06

Sequence analysis of variable regions of white spot syndrome virus from *Procambarus clarkii* in Anhui Province

CHEN Honglian, WANG Yongjie, JIANG Yelin, CHENG Yunsheng, ZHANG Jing, WANG Fen

(Fisheries Research Institute, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei 230031)

Abstract: White spot syndrome has caused significant economic loss in *Procambarus clarkii* industry in Anhui Province. To understand the molecular epidemiology of white spot syndrome virus (WSSV), we collected nine cultured *P. clarkii* samples between April and August 2016 from six cities in Anhui Province and performed nested-PCR analyses to detect WSSV and amplify the sequences of ORF94, ORF75 and ORF125 variable regions. The results were as follows: nine samples were all WSSV positive in the first PCR amplification. The numbers of repeats units (RU) in ORF94 were 2, 4, 7, 8 and 12, while 2 RUs was the dominant genotype. The numbers of compound RUs in ORF75 were 3, 6, 9, 10 and 11. The most dominant genotype displayed 9 RUs with the positioning of 45, 102, 45, 102, 3×45, 102 and 45. The RUs numbers of ORF125 ranged from 5 to 9, and the most prevalent genotypes were 7 RUs and 6 RUs.

Key words: *Procambarus clarkii*; white spot syndrome virus; ORF94; ORF75; ORF125; sequence analysis

白斑综合征病毒 (white spot syndrome virus, WSSV) 是线头病毒科 (Nimaviridae) 白斑病毒属 (*Whispovirus*) 的唯一成员, 最早在台湾和大陆南方沿海的对虾中流行^[1], 后来肆虐全球对虾, 具有发病急、死亡率高的特点, 给对虾养殖业造成巨大的经济损失, 早已被世界动物卫生组织 (OIE) 列为必须申报的疾病之一, 中国农业部将其列为一类动物疫病。2007 年美国路易斯安那州和中国南京、

舟山的养殖克氏原螯虾被报道出现白斑综合征疫情^[2-4]。现在该病在全国各省市养殖的克氏原螯虾中均有暴发, 安徽为国内克氏原螯虾主要养殖区之一, 疫情十分严重。

WSSV 的基因组大小约 300 kb, Marks 等^[5]对台湾株 (WSSV-TW, AF440570)、中国大陆株 (WSSV-CN, AF332093) 和泰国株 (WSSV-TH, AF369029) 的全基因组序列进行比较分析, 发现它

收稿日期: 2017-04-17

基金项目: 安徽省农科院学科建设项目 (16A0516), 安徽省农科院科技创新团队 (14C0504); 安徽省农科院院士工作站 (科人[2014]12) 共同资助。

作者简介: 陈红莲, 博士, 助理研究员。E-mail: hlchen76@163.com

* 通信作者: 王永杰, 博士, 研究员。E-mail: hfwangyongjie@163.com

们的相似度达 99.32%，差异区域主要为大序列缺失区 ORF23/24，易于发生基因重组的可变区 ORF14/15，及可变区 ORF75、ORF94 和 ORF125 的重复单元数量变化 (variable number of tandem repeats, VNTR)。ORF75、ORF94 和 ORF125 的 VNTR 常被用于小地理范围 WSSV 病毒间基因变异研究的分子标记^[6]。目前，中国已有多省 WSSV 可变区 ORF75、ORF94 和 ORF125 的 VNTR 研究报道，包括海南、广西、江苏、浙江、河北、山东、辽宁、福建、广州、天津和湖北^[7-11]，目前尚未见安徽省 WSSV 可变区研究的报道。本研究于 2016 年在安徽省采集克氏原螯虾样本，扩增 WSSV 可变区 ORF75、ORF94 和 ORF125 序列，对其 VNTRs

进行分析，以期了解安徽省 WSSV 的分子流行病学，丰富白斑综合征防治的基础理论知识。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 WSSV 样本来源 本实验于 2016 年 4—8 月在安徽省滁州、合肥、安庆、六安、池州和芜湖市的 8 个克氏原螯虾养殖场采集 9 个样本，样本 4 与 5 采自同一个养殖场的不同塘口，各样本取虾 20~30 只，体重约 20 g，所有样本采集后均置于 -80℃ 冰箱保存备用。9 个采样点中有 2 个在养殖期间未出现爆发性死亡，其他采样点均出现爆发性死亡，详见表 1。

表 1 样本来源

Table 1 Source of the samples

样本编号 Sample number	1	2	3	4	5	6	7	8	9
来源 Source	滁州	合肥	安庆	六安	六安	合肥	滁州	池州	芜湖
发病情况 Incidence	发病	未发病	发病	发病	发病	发病	未发病	发病	发病

1.2 方法

1.2.1 WSSV PCR 检测 取适量克氏原螯虾鳃组织进行研磨，用 TIANamp Genomic DNA Kit (离心柱型 DP304) 提取 DNA，采用 WSSV 国标 GB/T28630 的方法进行 PCR 扩增，套式 PCR 的引物及反应条件见表 2。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳分析。

1.2.2 WSSV 可变区 PCR 扩增 用鳃组织抽提的

DNA 扩增 WSSV 可变区 ORF75、ORF94 和 ORF125 序列。PCR 反应体系：无菌蒸馏水 33.5 μL，10×PCR 缓冲液 5 μL (含 1.5 mmol·L⁻¹ MgCl₂)，4×dNTP 混合物 4 μL (2.5 μmol·L⁻¹)，引物各 1.0 μL (40 μmol·L⁻¹)，Taq DNA 聚合酶 0.5 μL (5.0×10⁶ U·L⁻¹)，模板 DNA 5 μL。PCR 使用的引物，其在 WSSV-TW 序列上的位置及 PCR 反应条件见表 2。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳分析。

表 2 PCR 扩增引物及反应条件

Table 2 PCR primers and cycling conditions

引物 Primer	序列 Sequence (5'-3')	退火温度/℃, 延伸时间/s Annealing temperature, Elongation time	在 WSSV-TW 序列上位置 Sequence coordinates at WSSV-TW	理论产物大小/bp Expected product size
146F1	ACTACTAACTTCAGCCTATCTAG	55, 90	259 207~259 229	1 447
146R1	TAATGCGGGTGTAAATGTTCTTACGA		260 629~260 653	
146F2	GTAAGTCCCTTCCATCTCCA	55, 90	259 458~259 479	941
146R2	TACGGCAGCTGCTGCACCTTGT		260 377~260 398	
ORF75F1	TACTACTGCCCTGCTGTTT	53, 70	92 264~92 282	1 984
ORF75R1	AACCTCCACATCTCCTTCTA		94 249~94 248	
ORF125F	CGAAATCTTGATATGTTGTGC	51, 60	172 444~172 464	789
ORF125R2	CCATATCCATTGCCCTTCTC		173 214~173 233	
ORF94F	CTGGGTGGCATCGGTTAG	60, 90	127 102~127 119	643
ORF94R	CGTCACTTTCGTGCGTAGT		127 727~127 745	

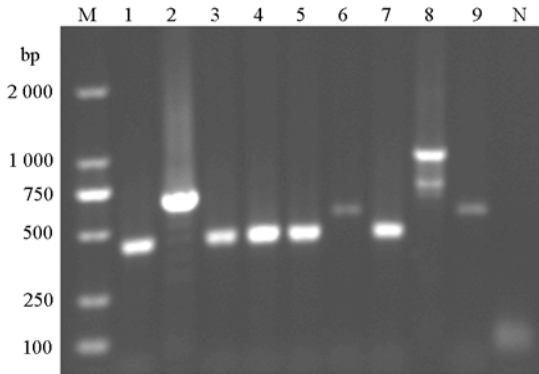
1.2.3 基因克隆及序列分析 WSSV 可变区 ORF75、ORF94 和 ORF125 阳性 PCR 产物经 Takara MINIBEST agarose gel DNA extraction kit 纯化回收，与 pMD18-T 连接，然后转化感受态 DH5a，接着涂

布于含氨苄青霉素 (100 μg·mL⁻¹) 的 LB 琼脂平板上，37℃ 培养过夜，阳性克隆增菌后送上海生工生物有限公司测序。用 Tandem Repeats Finder (TRF) 软件分析 WSSV 可变区的重复序列^[12]。

2 结果与分析

2.1 WSSV PCR 检测结果

采集的 9 个养殖克氏原螯虾样本均在第 1 轮 WSSV PCR 扩增中获得阳性结果。



M: Mark DL2000; 1~9: 样本编号; N: 阴性对照。

下同

M: Mark DL2000; 1-9: number of samples; N: negative control. The same below

图 1 WSSV 可变区 ORF94 的 PCR 扩增

Figure 1 PCR amplification of ORF94 variable region in WSSV

2.2 ORF94 PCR 扩增结果及序列分析

池州样本 8 可变区 ORF94 扩增出 2 个扩增子, 其他样本均产生单扩增子 (见图 1)。10 个扩增子中含 5 种不同大小的片段, 大小为 428~968 bp, 对应的 54 bp 重复单元 (repeat unit, RU) 基因型为 5 个, RU 数量为 2、4、7、8 和 12, 分别从 5 个 (六安、

滁州和安庆)、2 个 (芜湖和合肥)、1 个 (合肥)、1 个 (池州)、1 个 (池州) 样本中检出 (表 3)。这些扩增子在 RU 第 48 位碱基上出现 G 或者 T 的单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP), 但同一基因型的扩增子序列完全一致。

表 3 WSSV 可变区 ORF94 的序列分析

样本 Sample	扩增子大小/bp Amplicon size	RUs	SNPs
1, 3, 4, 5, 7	428	2	G,T
2	695	7	G,G,T,T,T,T,G
6, 9	536	4	G,T,T,T
8	968	12	T,T,T,T,T,T,G,G, G,G,G,G,G
	752	8	T,T,T,T,T,T,T,T

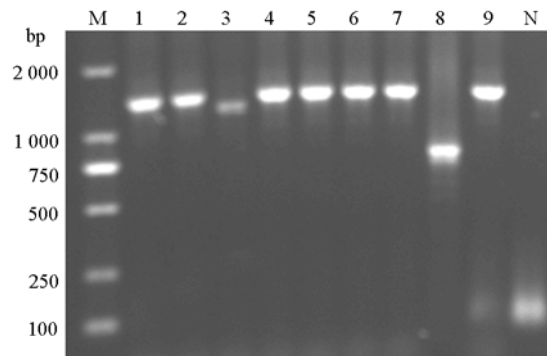


图 2 WSSV 可变区 ORF75 的 PCR 扩增

Figure 2 PCR amplification of ORF75 variable region in WSSV

表 4 WSSV 可变区 ORF75 的序列分析

样本 Sample	扩增子大小/bp Amplicon size	数量 (45 bp, 102 bp) Number	排序 Positioning	SNPs
1	1 331	9(6,3)	45, 102, 45, 102, 3×45, 102, 45	a-L-c-M-f-e-d-P-d
2	1 365	11(9,2)	45, 102, 6×45, 102, 2×45	a-L-b-c-f-e-c-d-P-d-c
3	1 140	6(4,2)	45, 102, 45, 102, 2×45	a-L-b-N-d-d
4, 5	1 334	9(6,3)	45, 102, 45, 102, 3×45, 102, 45	a-L-c-M-f-e-d-P-d
6, 7	1 332	9(6,3)	45, 102, 45, 102, 3×45, 102, 45	a-Q-c-M-f-e-d-P-d
8	717	3(2,1)	102, 2×45	M-d-c
9	1 376	10(7,3)	45, 102, 45, 102, 3×45, 102, 2×45	a-L-b-M-f-e-d-O-d-c

注: 45 bp RU 的第 3、15、30、40、42、44 位点的 SNPs 为 TTAAAG (a)、CCAGAA (b)、CCAAGG (c)、CCTAGG (d)、CCAAAG (e) 和 TTGAGG (f)。102 bp RU 的第 3、15、25、30 和 83 位点的 SNPs 为 TTGGC (L)、CCGGC (M)、CCGAT (N)、CCGTC (O)、CCGTC (P) 和 TTAGC (Q)。

Note: The SNPs of each 45 bp repeat unit at positions 3, 15, 30, 40, 42, 44 are TTAAAG (a), CCAGAA (b), CCAAGG (c), CCTAGG (d), CCAAAG (e) and TTGAGG (f), respectively. The SNPs of each 102 bp repeat unit at positions 3, 15, 25, 30, 83 are TTGGC (L), CCGGC (M), CCGAT (N), CCGTC (O), CCGTC (P) and TTAGC (Q), respectively.

2.3 ORF75 PCR 扩增结果及序列分析

9 个样本 ORF75 扩增均获得 1 个扩增子, 结果见图 2。扩增子的序列为 717~1 376 bp, 每个扩增子均

存在 2 种 RUs, 45 bp 和 102 bp, 2 种 RUs 总数为 3、6、9、10 和 11 (见表 4)。9 RUs 来自 5 个样本 (合肥、六安和滁州), 排列顺序均为 45、102、45、102、

3×45、102 和 45, 其他 4 个样本扩增子 RUs 数量及排列方式均不相同。除池州样本 8 的扩增子 RUs 排列以 102 和 2×45 开头外, 其他的 RUs 排列均以 45、102 和 45 开头, 第 4 个 RU 出现差异。获得扩增子在 45 bp RU 的第 3、15、30、40、42 和 44 位点和 102 bp RU 的第 3、15、25、30 和 83 位点存在 SNPs。9 RUs 的 5 个扩增子除 102 bp RU 的 25 位点存在 SNP 变异外, 其他序列一致。

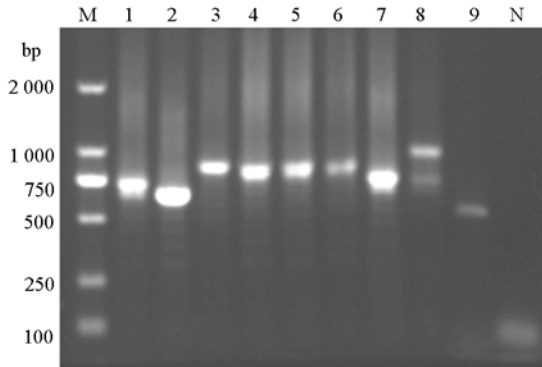


图 3 WSSV 可变区 ORF125 的 PCR 扩增

Figure 3 PCR amplification of ORF94 variable region in WSSV

2.4 ORF125 PCR 扩增结果及序列分析

池州样本 8 可变区 ORF125 扩增出 2 个扩增子,

其他样本均扩增出 1 个扩增子 (见图 3)。扩增子的序列为 652~929 bp, RUs 为 5~9, 其中 7 RUs、6 RUs 分别从 4 个、3 个样本中扩增 (见表 5)。扩增子的开始 RUs 为 72 bp, 比其他 RUs 多 18~20 位的 GCA 碱基。开始 RUs 具有独特的 SNPs, 指定为 A 和 B。样本 4 和 5 的开始 RUs 排序为 AAB, 样本 9 的排序为 AAAB, 其他样本的排序均为 AB。中间 RUs 有 2~6 个, 第 18, 66 和 69 位核苷酸有 SNPs, 指定为 C-F。结尾 RUs 也具有独特的 SNPs, 指定为 T, T 的数量为 0~3, 不同扩增子间 T 的序列完全一致。10 个扩增子中只有安庆的样本 4 和 5 的 RUs 排列完全一致, 滁州的样本 1 和 7 的中间 RUs 第 18 位存在 SNP。

3 讨论与结论

本研究从安徽省 6 个市采集的 9 个养殖克氏原螯虾样本 WSSV PCR 检测结果均为阳性, 从水库和鱼塘取样的 6 个野生克氏原螯虾样本 (合肥 5 个, 舒城 1 个) PCR 检测结果均为阴性 (数据未显示), 表明目前 WSSV 主要在安徽人工养殖的克氏原螯虾中流行。

表 5 WSSV 可变区 ORF125 的序列分析

Table 5 Sequence analysis of ORF125 variable region in WSSV

样本 Sample	扩增子大小/bp Amplicon size	RUs (A+B,C-F,T)	排列方式 Positioning
1	721	6 (2, 3, 1)	ABC CET
2	652	5 (2, 2, 1)	ABC ET
3	859	8 (2, 3, 3)	ABDC ETTT
4, 5	793	7 (3, 4, 0)	AABCC CE
6	790	7 (2, 4, 1)	ABDDD FT
7	721	6 (2, 3, 1)	ABDD E T
8	929	9 (2, 6, 1)	ABDDDD C ET
	721	6 (2, 4, 0)	ABDD C E
9	569	7 (4, 1, 2)	AAAB E TT

注: 开始 RUs 被指定为 A 和 B, 结尾 RUs 被指定为 T, 中间 RUs 的 18, 66, 69 位点的 SNPs 分别为 TTC (C)、GTC (D)、TGT (E) 和 GGT (F)。

Note: The first RUs are defined as A and B, respectively, the last RUs are defined as T, the SNPs of each intervening RUs at positions 18, 66 and 69 are TTC (C), GTC (D), TGT (E) and GGT (F), respectively.

本实验 9 个样本 WSSV ORF94 有 5 个基因型, RUs 为 2、4、7、8 和 12, 其中 2 RUs 存在于六安、滁州和安庆的 5 个样本中, 这是国内外最小的常见基因型。海南、广西、江苏、浙江、河北、山东、辽宁、福建、广州、天津和湖北 WSSV ORF94 的 RUs 为 3~14^[7-11], 6 RUs 为常见基因型^[9]。国外 WSSV ORF94 RUs 介于 2~20, 7 RUs 和 8 RUs 为越南和印度的常见基因型^[6,13-15]。Pradeep 等^[6]和 Hoa

等^[15]分别对印度、越南的 WSSV 进行研究, 发现发病塘口的 WSSV ORF94 优势基因型 RUs<8, 而不发病塘口的 RUs>9。特别是 2 RUs 被报道只存在于印度虾发病的塘口^[6]。Marks 等^[16]和 Pradeep 等^[17]发现在多株 WSSV 混合感染宿主时, 经过 1~2 代, 只检测到基因组小的病毒。因此, 推测安徽 WSSV ORF94 的 2 RUs 在传播过程中具有竞争优势, 将在安徽省养殖克氏原螯虾中继续存在。安徽 ORF94

RU以“CGC”开头计算第48位出现SNP,这个位点的变异普遍存在于国内外的WSSV中^[18]。

本实验中WSSV ORF75扩增子的RUs为3、6、9、10和11,其中9RUs来自合肥、六安、滁州的5个样本,为常见基因型,在国内外,该基因型只在山东胶南检测到^[7]。池州WSSV ORF75最小组合为3RUs,这是国内外文献报道的最小ORF75RUs。已报道的中国WSSV ORF75RUs介于4~13^[7-8,11]。国外WSSV ORF75RUs介于5~15^[6,19-20],13RUs为印度的常见基因型^[6],5RUs在越南较常见^[19]。池州样本8WSSV ORF75的组合RUs以102,45开始排列,与越南5RUs或6RUs基因型的排列类似^[19]。其他8个样本ORF75组合RUs的排列均以45、102和45开始,这与国内外许多文献报道的结果一致^[6-8,20]。安徽WSSV ORF75的45bpRU第3、15、30、40、42和44位点和102bpRU的第3、15、25、30和83位点存在SNPs,除102bpRU第25位点出现新的SNPs外,其他位点的SNPs与Zeng等^[8]的报道一致。

本实验WSSV ORF125的RUs为5~9,7RUs从六安、合肥和芜湖的4个样本获得,6RUs从滁州和池州的3个样本获得。这2种基因型,在国内广泛分布于江苏、广东、山东、天津和河北^[7-8,10-11],也是越南的常见基因型^[16,19]。拉丁美洲、印度的常见基因型分别为8RUs和4RUs^[6,20]。已报道的越南和中国WSSV ORF125扩增子VNTRs均以2个独特SNPs的RUs开始,1个独特SNPs的RU结尾^[7-8,19]。本研究中5个WSSV ORF125扩增子VNTRs排序与报道一致,另6个扩增子出现一些新的变化,开始RUs为2~4,结尾RUs为0~3。一些报道表明,WSSV中间RUs的第8、18、25、66和69位点出现SNPs^[8,19],安徽WSSV的中间RUs变异位点减少,只在第18、66和69位出现SNPs。

本研究中池州样本8可变区ORF94和ORF125均扩增出2个不同大小的扩增子,揭示取样池塘克氏原螯虾体内存在不同基因型病毒混合感染的情况。因样本8的3个可变区产生的扩增子数量不同,去掉该样本数据,发现另8个样本WSSV的ORF94只有3个基因型,ORF75和ORF125均有4个基因型。这与之前的报道不一致,ORF94一直被认为是RU数量变化最多的基因,也因此被认为是3个基因中最适合用于小地理范围进行WSSV基因组变异研究的基因^[6,19-21]。这可能是由于5个样本WSSV的ORF94VNTRs已经进化到2RUs,通过删除RU实现进化的空间受限。

本研究中9个样本均在WSSV第1轮检测中出现阳性,表明样本中均存在大量病毒,但样本2和7取样点克氏原螯虾未出现暴发性死亡,取样点分别为茭白-虾共生田、稻虾连作田,分析其原因是养殖密度适当,池塘水质好。特别是样本7,与样本1同来源于滁州,其病原3个可变区只有1个核苷酸的差异,但样本1塘口虾的死亡率超过60%,究其原因,样本1取自高密度养殖塘,没有水草,水质差。这与Hoa等^[21]、Olivier和Roel^[22]的研究结果一致,白斑综合征的暴发与虾的养殖环境密切相关,因此,控制养殖环境是防治克氏原螯虾白斑综合征的重要环节。

参考文献:

- [1] CHOU H Y, HUANG C Y, WANG C H, et al. Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured *Penaeid shrimp* in Taiwan [J]. *Dis Aquat Org*, 1995, 23: 165-173.
- [2] 王忠发, 何伟贤, 许文军. 白斑综合征病毒引起小龙虾疫病爆发流行的病原学研究[J]. *中国卫生检验杂志*, 2007, 17(8):1397-1399.
- [3] 丁正峰, 薛晖, 夏爱军, 等. 白斑综合征病毒在养殖克氏原螯虾中感染流行研究[J]. *南京农业大学学报*, 2008,31(4):129-133.
- [4] BAUMGARTNER W A, HAWKE J P, BOWLES K, et al. Primary diagnosis and surveillance of white spot syndrome virus in wild and farmed crawfish (*Procambarus clarkii*, *P. zonangulus*) in Louisiana, USA [J]. *Dis Aquat Org*, 2009, 85: 15-22.
- [5] MARKS H, GOLDBACH R W, VLAK J M, et al. Genetic variation among isolates of white spot syndrome virus [J]. *Arch Virol*, 2004, 149(4): 673-697.
- [6] PRADEEP B, SHEKAR M, GUDKOVS N, et al. Genotyping of white spot syndrome virus prevalent in shrimp farms of India [J]. *Dis Aquat Org*, 2008, 78: 189-198.
- [7] 于洪涛. 中国境内白斑综合征病毒(WSSV)分离株的序列差异分析[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2008:1-96.
- [8] ZENG W, ZENG Y, FEI R, et al. Analysis of variable genomic loci in white spot syndrome virus to predict its origins in *Procambarus clarkii* crayfish farmed in China [J]. *Dis Aquat Org*, 2011, 96(2): 105-112.
- [9] TAN Y W, SHI Z L. Genotyping of white spot syndrome virus in Chinese cultured shrimp during 1998-1999 [J]. *Virol Sinica*, 2011, 26(2): 123-130.
- [10] 孙新颖, 万晓媛, 刘庆慧, 等. 2013年中国典型对虾养殖区白斑综合征病毒流行株高变异区序列的分析比较[J]. *中国水产科学*, 2016,23(3):693-703.
- [11] 孙新颖, 万晓媛, 刘庆慧, 等. 白斑综合征病毒2014年中国毒株变异区的序列比较[J]. *渔业科学进展*, 2016,37(2):127-133.
- [12] BENSON G. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences[J]. *Nucleic Acids Res*, 1998, 27(2): 573-

- 580.
- [13] WONGTEERASUPAYA C, PUNGCHAI P, WITHYACHUMNARNKUL B, et al. High variation in repetitive DNA fragment length for white spot syndrome virus (WSSV) isolates in Thailand [J]. *Dis Aquat Org*, 2003, 54(3): 253-257.
- [14] MUSTHAQ S S, SUDHAKARAN R, ISHAQ AHMED V P, et al. Variability in the tandem repetitive DNA sequences of white spot syndrome virus (WSSV) genome and suitability of VP28 gene to detect different isolates of WSSV from India [J]. *Aquaculture*, 2006, 256: 34-41.
- [15] HOA T T T, ZWART M P, PHUONG N T, et al. Low numbers of repeat units in variable number of tandem repeats (VNTR) regions of white spot syndrome virus are correlated with disease outbreaks [J]. *J Fish Dis*, 2012, 35(11): 817-826.
- [16] MARKS H, VAN DUIJSE J J, ZUIDEMA D, et al. Fitness and virulence of an ancestral white spot syndrome virus isolate from shrimp [J]. *Virus Research*, 2005, 110: 9-20.
- [17] PRADEEP B, KARUNASAGAR I, KARUNASAGAR I. Fitness and virulence of different strains of white spot syndrome virus [J]. *J Fish Dis*, 2009, 32(9): 801-805.
- [18] SHEKAR M, PRADEEP B, KARUNASAGAR I. White spot syndrome virus: genotypes, epidemiology and evolutionary studies [J]. *Indian J Virol*, 2012, 23(2): 175-183.
- [19] DIEU B T M, MARKS H, SIEBENGA J J, et al. Molecular epidemiology of white spot syndrome virus within Vietnam [J]. *J Gen Virol*, 2004, 85: 3607-3618.
- [20] MULLER I C, ANDRADE T P D, TANG-NELSON K F J, et al. Genotyping of white spot syndrome virus (WSSV) geographical isolates from Brazil and comparison to other isolates from the Americas [J]. *Dis Aquat Org*, 2010, 88(2): 91-98.
- [21] HOA T T T, ZWART M P, PHUONG N T, et al. Transmission of white spot syndrome virus in improved-extensive and semi-intensive shrimp production systems: a molecular epidemiology study [J]. *Aquaculture*, 2011, 313: 7-14.
- [22] OLIVIER M J, ROEL H B. Typology of shrimp farming in Bac Lieu Province, Mekong Delta, using multivariate statistics [J]. *Agricul Ecosyst Environ*, 2009, 132(1/2): 153-159.