

ỨNG DỤNG PHƯƠNG PHÁP PCR-GENOTYPING (ORF94) TRONG NGHIÊN CỨU VI RÚT GÂY BỆNH ĐÓM TRẮNG TRÊN TÔM SÚ (*Penaeus monodon*)

Trần Thị Tuyết Hoa¹, Triệu Thanh Tuấn và Nguyễn Thanh Phương¹

ABSTRACT

White spot disease, causative agent is white spot syndrome virus (WSSV), is one of the serious diseases responsible for most economic losses in the shrimp farming industry in the Mekong Delta and worldwide. This study aims to identify molecular markers that discriminate different WSSV genotypes causing the disease in black tiger shrimps. PCR-genotyping amplified tandem repeat region of 54bp in ORF94 (GenBank AF369029) was used to analyze 169 WSSV-infected shrimps collected from 19 diseased shrimp ponds in Bac Lieu and Ca Mau provinces. The result shows that (i) there are 7 different tandem-repeat-sequence (TRS) groups: 4-, 5-, 6-, 7-, 9-, 12- and 16-TRS), with the WSSV genotype of 5-TRS being the most prevalence. In Bac Lieu province, there are 6 WSSV genotypes 4-TRS, 5-TRS, 7-TRS, 9-TRS, 12-TRS, 16-TRS at percentages 11,1%, 48,8%, 1,1%, 22,2%, 11,1% and 5,7%, respectively. In Ca Mau province, four WSSV genotypes were identified at these frequencies 68,4% of 5-TRS, 7,6% of 6-TRS, 14% of 7-TRS and 28,6% of 9-TRS. (ii) The number of tandem-repeat-sequences of WSSV isolates remains constant across the diseased shrimp ponds (16/19 ponds). The results obtained so far suggest that PCR-genotyping (ORF94) is a suitable method for WSSV strains identification.

Keywords: *White spot syndrome virus, molecular marker, ORF94*

Title: *Application of PCR-genotyping (ORF94) to study white spot syndrome virus (WSSV) infection in shrimp (Penaeus monodon)*

TÓM TẮT

Bệnh đốm trắng, tác nhân là *white spot syndrome virus (WSSV)*, là một trong những bệnh gây thiệt hại nghiêm trọng đến nghề nuôi tôm biển ở vùng ĐBSCL và trên toàn thế giới. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm tìm ra chỉ thị phân tử đánh dấu sự khác nhau về kiểu gen của WSSV gây bệnh trên tôm sú. Phương pháp PCR-genotyping khuếch đại đoạn lặp lại 54bp thuộc ORF94 (GenBank AF369029) được sử dụng phân tích 169 mẫu tôm bệnh đốm trắng thu được từ 19 ao tôm bệnh ở Bạc Liêu và Cà Mau. Kết quả cho thấy (i) hiện diện 7 nhóm kiểu gen WSSV có các vùng lặp lại (TRS) khác nhau (4-, 5-, 6-, 7-, 9-, 12- và 16-TRS) với kiểu gen có 5-TRS chiếm ưu thế. Ở Bạc Liêu có 6 kiểu gen, với 4-TRS chiếm 11,1%, 5-TRS chiếm 48,8%, 7-TRS chiếm 1,1%, 9-TRS chiếm 22,2%, 12-TRS chiếm 11,1% và 16-TRS chiếm 5,7%. Ở Cà Mau xác định được 4 kiểu gen với tỉ lệ xuất hiện của 5-TRS là 68,4%, 6-TRS là 7,6%, 7-TRS là 14% và 9-TRS là 28,6%; (ii) số vùng lặp lại trên bộ gen WSSV thường giống nhau (16/19 ao) trong cùng một ao tôm bệnh. Kết quả ghi nhận khả năng sử dụng tốt của kỹ thuật PCR-genotyping (ORF94) trong việc phân biệt các dòng WSSV.

Từ khoá: *virút gây bệnh đốm trắng, chỉ thị phân tử, ORF94*

1 GIỚI THIỆU

Bệnh đốm trắng do tác nhân *white spot syndrome virus (WSSV)* gây ra là một trong những bệnh nguy hiểm nhất và gây thiệt hại nghiêm trọng đến ngành công nghiệp nuôi tôm trên thế giới (Flegel *et al.*, 1997). Bệnh xuất hiện đầu tiên vào khoảng giai đoạn 1991-1992 ở Châu Á, và ngày nay WSSV phân bố rộng khắp trên thế giới. Những nghiên cứu gần đây cho thấy, WSSV đã có nhiều biến thể về bộ gen. Trình tự bộ gen của virus gây bệnh đốm

¹ Bộ môn Sinh học và Bệnh Thủy sản, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

trắng đã được giải mã (Wang *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 2001 và van Hulten *et al.*, 2001) và cho thấy WSSV là một trong những vi rút với acid nhân là ADN có kích thước lớn. So sánh trình tự cả bộ gen của 3 dòng WSSV phân lập trên tôm từ Thái lan, Đài Loan và Trung Quốc cho thấy sự tương đồng trên 99% và xác định được một số vùng có trình tự lặp lại thuộc ORF14/15, ORF23/24, ORF75, ORF94 và ORF125 (Marks *et al.*, 2004). Trong đó, các vùng lặp lại thuộc ORF75, ORF94 và ORF125, đã được xác định là một trong những chỉ thị hữu ích cho các nghiên cứu về dịch tễ học và sinh thái học của WSSV.

Trong nghiên cứu này, vùng lặp lại thuộc ORF94 được chọn để so sánh giữa các dòng WSSV thu được từ các ao tôm bộc phát bệnh đốm trắng. Nghiên cứu thực hiện nhằm tìm ra chỉ thị ở mức độ phân tử đánh dấu sự khác nhau về các kiểu gen của WSSV gây bệnh trên tôm ở Bạc Liêu và Cà Mau và tìm hiểu về đặc điểm gen của các dòng WSSV thu thập từ các ao tôm bị bệnh đốm trắng thuộc địa bàn nghiên cứu.

2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Mẫu tôm dùng trong nghiên cứu

Tổng số 169 mẫu tôm sú dùng cho nghiên cứu được thu từ 19 ao tôm có dấu hiệu bệnh đốm trắng ở hai tỉnh Bạc Liêu (Giá Rai, Phước Long, Thị Xã Bạc Liêu và xã Hiệp Thành) và Cà Mau (Tân Thành, Cái Nước và Thới Bình). Các thông tin về nguồn gốc tôm như nơi thu mẫu, thời gian thu mẫu, nguồn gốc tôm giống, tuổi của tôm cũng được ghi nhận.

2.2 Phương pháp PCR phát hiện WSSV

Mẫu tôm sú thu được chiết tách bằng qui trình CTAB-DTAB và khuếch đại bằng qui trình PCR 2 bước (Thao tác ly trích mẫu và khuếch đại phát hiện WSSV được thực hiện theo qui trình hướng dẫn sử dụng Kit IQ2000-WSSV của công ty Farming Intelligene Technology Corporation, Đài Loan).

2.3 Phương pháp PCR-genotyping

Sử dụng qui trình PCR-genotyping của Wongteerasupaya *et al.*, (2003) với một số bước được tối ưu hóa cho phù hợp với điều kiện của phòng thí nghiệm. Trong đó, 2µl DNA mạch khuôn được cho vào hỗn hợp các thành phần phản ứng PCR (10X Buffer, 25mM MgCl₂; 10mM dNTPmix; *Taq*DNA polymerase (Promega) 5U/µl; 25 pmol mỗi ORF94-F và 25 pmol mỗi ORF94-R)

Khuếch đại DNA sử dụng hai cặp mồi trình bày trong Bảng 2.1

Bảng 2.1: Trình tự mồi sử dụng trong phản ứng PCR-genotyping

Tên mồi	Trình tự	Nhiệt độ nóng chảy (T _m)
ORF94-F	5'-TCTACTCGAGGAGGTGACGAC-3'	66°C
ORF94-R	5'-CATGAAATGTGTACACACCTG-3'	66°C

Điều kiện phản ứng bao gồm các bước 94⁰C trong 20 giây, 60⁰C trong 20 giây, 72⁰C trong 1 phút. Lặp lại 40 chu kỳ và cuối cùng là kéo dài ở 72⁰C trong 10 phút.

Sản phẩm PCR-genotyping được điện di bằng gel agarose 2% có chứa 0,5 µg/ml ethidium bromide, trong dung dịch 0,5X TAE (Tris-acetate-EDTA) ở 90V và ghi nhận với thiết bị chụp, xử lí ảnh gel (Vilber Lourmat). Kích thước sản phẩm PCR tính bằng công thức: X + 54 * n, trong đó n là số vùng lặp lại và X là khoảng cách (bp) từ vị trí mồi đến vị trí vùng lặp lại.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Đặc điểm của vùng lặp lại thuộc ORF94 trên các mẫu tôm thu ở Bạc Liêu.

Mẫu tôm sú dùng trong nghiên cứu thu được từ các ao nuôi tôm có dấu hiệu của bệnh đốm trắng ở huyện Giá Rai (4 ao), Phước Long (3 ao), xã Hiệp Thành (1 ao) và Thị Xã Bạc Liêu (1 ao) trong khoảng thời gian từ tháng 4 đến tháng 6/2006 (Bảng 3.1).

Bảng 3.1: Thông tin chung về mẫu tôm thu được ở Bạc Liêu

Mã số	Ngày thu mẫu	Địa điểm thu mẫu	Nguồn tôm giống
BL1	23/04/2006	Giá Rai, BL	Gành Hào, BL
BL2	24/05/2006	Giá Rai, BL	Gành Hào, BL
BL3	16/06/2006	Giá Rai, BL	Gành Hào, BL
BL4	16/06/2006	Phước Long, BL	Gành Hào, BL
BL5	16/06/2006	Phước Long, BL	Gành Hào, BL
BL7	16/06/2006	Phước Long, BL	Gành Hào, BL
BL8	23/04/2006	Hiệp Thành, BL	Thị Xã Bạc Liêu
BL9	02/06/2006	Thị Xã Bạc Liêu	Thị Xã Bạc Liêu
BL10	30/04/2006	Giá Rai, BL	Gành Hào, BL

Sản phẩm khuếch đại trên tổng số 90 mẫu DNA li trích được từ tôm bị nhiễm WSSV bằng phương pháp PCR-genotyping, sử dụng cặp mồi ORF94-F và ORF94-R cho thấy có sự khác nhau về số vùng lặp lại trên bộ gen của WSSV giữa các ao thu được và cả trong cùng một ao (Hình 3.1). Kết quả cho thấy có 6 nhóm vùng lặp lại khác nhau, từ 4 đến 16 vùng (Bảng 3.2). Trong đó, số mẫu có 5 vùng lặp lại chiếm tỉ lệ cao nhất xấp xỉ 48,8% (44/90 mẫu). Thấp nhất là có 7 vùng lặp lại chiếm tỉ lệ 1,1% (1/90 mẫu). Số mẫu có 9 vùng lặp lại chiếm khoảng 22,2% (20/90 mẫu). Số mẫu có số vùng lặp lại là 4, 12 và 16 vùng lặp lại chiếm tỉ lệ lần lượt là 11,1% (10/90 mẫu), 11,1% (10/90 mẫu) và 5,7% (5/90 mẫu). Không có mẫu có 6, 8, 10, 11, 13, 14 và 15 vùng lặp lại. Tính đa dạng của các vùng lặp lại thuộc ORF94 của các dòng WSSV thu được tại địa bàn Bạc Liêu cũng tương ứng với kết quả trong nghiên cứu của Wongteerasupaya *et al.*, (2003), khi khuếch đại PCR với mẫu DNA ly trích từ tôm bị nhiễm WSSV ở Thái Lan sử dụng cặp mồi ORF94-F và ORF94-R đã xác định được 12 nhóm vùng lặp lại, từ 6 đến 20 vùng. Trong đó, 8 vùng lặp lại chiếm tỉ lệ cao nhất khoảng 32%.

Bảng 3.2: Các nhóm vùng lặp lại trên bộ gen WSSV trong các ao tôm bệnh đốm trắng ở Bạc Liêu

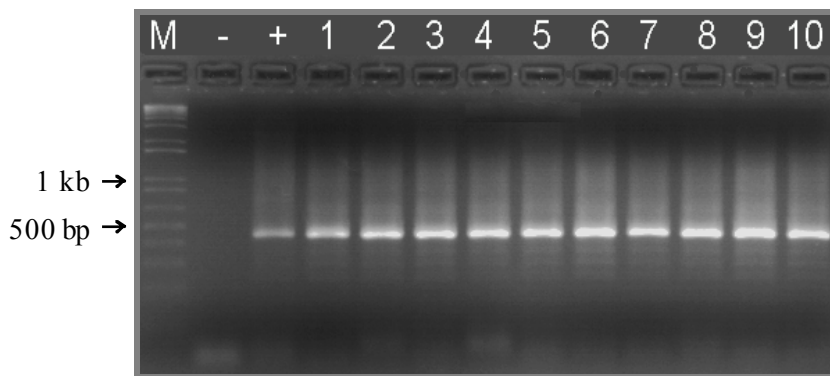
Số vùng lặp lại	Mã số ao tôm										Số mẫu phân tích
	BL1	BL2	BL3	BL4	BL5	BL7	BL8	BL9	BL10		
4							10				10
5			10	10	10	10			4		44
6											
7									1		1
8											
9		10						10			20
10											
11											
12	10										10
13											
14											
15											
16									5		5

Nghiên cứu của Dieu *et al.*, (2004) cũng tại vùng lặp lại thuộc ORF94, khi khuếch đại mẫu DNA ly trích từ tôm bị bệnh đốm trắng ở khu vực Duyên Hải miền Trung-Việt Nam đã xác định được các nhóm vùng lặp lại trên bộ gen của WSSV. Kết quả xác định được số vùng lặp lại nằm trong khoảng 7 đến 17 vùng.

Khi so sánh về số vùng lặp lại giữa các ao tôm bị bệnh đốm trắng cho thấy, các ao có kí hiệu BL3, BL4, BL5, BL7 và BL10 đều có 5 vùng lặp lại (Bảng 3.2). Trong đó, các ao BL3, BL4, BL5 và BL7 đều thu cùng một thời điểm (ngày 16/06/2006) thuộc huyện Giá Rai (BL3, BL10) và Phước Long (BL4, BL5 và BL7). Thông tin ghi nhận được cho thấy đây là các ao thả chung một nguồn tôm giống từ Gành Hào, Bạc Liêu (Bảng 3.1). Kết quả đạt được có thể dự đoán bệnh đốm trắng trên tôm sú ở các ao này gây ra do cùng một kiểu gen WSSV. Trong trường hợp này, có thể WSSV đã di chuyển theo phương ngang giữa các ao trong vùng và không loại trừ khả năng tôm giống bị cảm nhiễm WSSV trước khi thả nuôi. Ở Thái Lan, WSSV lây nhiễm trên tôm giống cũng là một trong những nguyên nhân gây bùng phát bệnh đốm trắng trên tôm nuôi (Withyachumnarnkul, 1999).

Tương tự đối với 2 ao BL2 và BL9 đều có 9 vùng lặp lại, và có khả năng cảm nhiễm cùng một kiểu gen WSSV.

Các ao BL1, BL8 và BL10 thu mẫu trong cùng một thời điểm (tháng 4/2006) nhưng có số vùng lặp lại khác nhau. BL1 và BL8 có số vùng lặp lại lần lượt là 12 và 4 vùng lặp lại. Đây là 2 ao thả giống có nguồn gốc khác nhau từ Gành Hào (BL1) và Thị Xã Bạc Liêu (BL8). Do đó, có nhiều khả năng cảm nhiễm 2 kiểu gen WSSV khác nhau. Riêng ao BL10 có 3 nhóm vùng lặp lại là 5, 7 và 16 vùng. Trường hợp này có thể do cảm nhiễm cùng lúc nhiều kiểu gen WSSV. Sự đa nhiễm các kiểu gen WSSV khác nhau trong cùng một ao cũng được ghi nhận. Hoa *et al.*, (2005), cho rằng sự cảm nhiễm cùng lúc nhiều kiểu gen (genotype) WSSV trên tôm sú (*P. monodon*) là phổ biến.



Hình 3.1: Kết quả điện di sản phẩm PCR bằng gel agarose 2%. M: DNA marker, (-): đối chứng âm, (+): đối chứng dương. Giếng 1-10: mẫu phân tích từ ao BL7. (mẫu có 5 vùng lặp lại)

Như vậy sự tồn tại nhiều kiểu gen WSSV ở các địa bàn khác nhau thuộc tỉnh Bạc Liêu đã được xác định. Kiểu gen WSSV với 5 vùng lặp lại chiếm tỉ lệ cao nhất trong tổng số mẫu phân tích, xấp xỉ 48,8%. Con đường lan truyền của WSSV rất có thể là từ tôm giống cảm nhiễm WSSV, kết hợp với khả năng lây nhiễm và lan truyền từ nguồn nước và qua vật chủ trung gian. Việc nghiên cứu về dịch tễ học của WSSV ở mức độ phân tử là cần thiết để giải thích vấn đề này.

3.1 Đặc điểm của vùng lặp lại thuộc ORF94 trên các mẫu tôm thu ở Cà Mau

Mẫu tôm sú có dấu hiệu của bệnh đốm trắng được thu ở huyện Cái Nước (4 ao), Tân Thành (5 ao) và huyện Thới Bình (1 ao) trong khoảng thời gian từ tháng 2 đến tháng 5/2006. (Bảng 3.3).

Bảng 3.3: Thông tin chung về mẫu tôm thu được ở Cà Mau

Mã số	Ngày thu mẫu	Địa điểm thu mẫu	Nguồn gốc tôm giống
CM1	05/03/2006	Tân Thành, CM	Gành Hào, BL
CM2	09/03/2006	Tân Thành, CM	Gành Hào, BL
CM3	07/02/2006	Thới Bình, CM	Không xác định
CM4	07/03/2006	Tân Thành, CM	Gành Hào, BL
CM5	06/03/2006	Tân Thành, CM	Gành Hào, BL
CM6	06/03/2006	Tân Thành, CM	Gành Hào, BL
CM7	26/05/2006	Cái Nước, CM	Năm Căn, CM
CM8	26/05/2006	Cái Nước, CM	Năm Căn, CM
CM9	26/05/2006	Cái Nước, CM	Năm Căn, CM
CM10	26/05/2006	Cái Nước, CM	Năm Căn, CM

Sản phẩm khuếch đại trên tổng số 79 mẫu DNA chiết tách được từ tôm bị nhiễm WSSV bằng phương pháp PCR-genotyping, sử dụng cặp mồi ORF94-F và ORF94-R cho thấy có sự khác nhau về số vùng lặp lại trên bộ gen của WSSV giữa các ao thu được. Kết quả cho thấy có 4 nhóm vùng lặp lại khác nhau, từ 5 đến 9 vùng. Trong đó, số mẫu có 5 vùng lặp lại chiếm tỉ lệ cao nhất xấp xỉ 68,4% (54/79 mẫu). Thấp nhất là có 6 vùng lặp lại chiếm tỉ lệ 7,6% (6/79 mẫu). Số mẫu có 7 vùng lặp lại chiếm khoảng 14% (11/79 mẫu). Không có mẫu có 8 vùng lặp lại (Bảng 3.4).

Bảng 3.4: Các nhóm vùng lặp lại trên bộ gen của WSSV trong các ao tôm bệnh đốm trắng ở Cà Mau

Số vùng lặp lại	Mã số ao tôm										Số mẫu phân tích
	CM1	CM2	CM3	CM4	CM5	CM6	CM7	CM8	CM9	CM10	
5	2	6		5	6		5	10	10	10	54
6						6					6
7	1		10								11
8											
9	3						5				8

Kết quả phân tích cho thấy, số vùng lặp lại trên bộ gen của WSSV thu được ở Cà Mau có dãy phân bố khá hẹp (5 đến 9 vùng lặp lại). Kết quả này rất khác so với WSSV trên tôm thu được ở Bạc Liêu. Số vùng lặp lại trên bộ gen của WSSV ở Bạc Liêu nằm trong khoảng từ 4 đến 16 vùng lặp lại. Điều đáng chú ý là kiểu gen WSSV có 5 vùng lặp lại chiếm tỉ lệ cao nhất. Ở Bạc Liêu là 48,8% và 68,4% ở Cà Mau. Như vậy, có thể kết luận rằng kiểu gen WSSV với 5 vùng lặp lại gây bệnh đốm trắng trên tôm là phổ biến ở Bạc Liêu và Cà Mau.

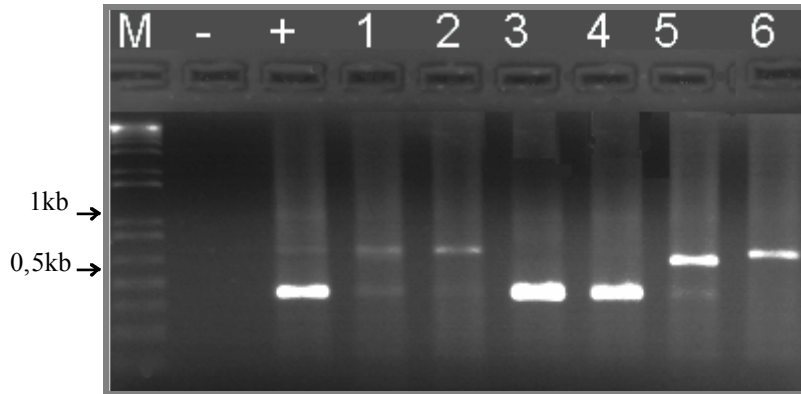
Bảng 3.5: Các nhóm vùng lặp lại trên bộ gen WSSV đối với mẫu tôm thu ở Cà Mau

Số vùng lặp lại	Kích thước sản phẩm PCR (bp)	Số mẫu tôm	Tỉ lệ % so với tổng số mẫu	Số ao
5	453	60	68,4	9 ^(*)
6	507	6	7,6	1
7	561	11	14	2 ^(*)
8	615	-	-	-
9	669	8	10	2 ^(*)
Tổng		79	100	

Ghi chú: ^(*) Ao CM1 có 3 nhóm vùng lặp lại trên bộ gen WSSV (5, 7 và 9 vùng), ao CM7 có hai nhóm vùng lặp lại trên bộ gen WSSV (5 và 9 vùng).

Theo Hoa *et al.*, (2005), khi phân tích mẫu tôm thu được từ các ao tôm bị bệnh đốm trắng bằng kỹ thuật PCR-genotyping cho thấy kiểu gen WSSV với 7 vùng lặp lại chiếm tỉ lệ cao nhất. Với nghiên cứu của Dieu *et al.*, (2004), khi khuếch đại vùng lặp lại thuộc ORF94 từ DNA chiết tách từ tôm bị bệnh đốm trắng ở khu vực Duyên Hải miền Trung-Việt Nam đã xác định được các nhóm vùng lặp lại trên bộ gen của WSSV nằm trong khoảng 7 đến 17 vùng lặp lại.

Bảng 3.4 cho thấy, các ao CM1, CM2, CM4, CM5, CM6, CM7, CM8, CM9 và CM10 đều có 5 vùng lặp lại. Kết quả này có thể kết luận bệnh đốm trắng trên tôm ở các ao này cảm nhiễm cùng một kiểu gen WSSV. Điều đáng chú ý là hầu hết các mẫu tôm bệnh đốm trắng trong cùng một ao thì có số vùng lặp lại trên bộ gen WSSV giống nhau (16/19 ao ở hai tỉnh Bạc Liêu và Cà Mau). Tuy nhiên, ngoại trừ mẫu tôm thu từ 2 ao CM1 và CM7 có nhiều nhóm vùng lặp lại trên bộ gen WSSV khác nhau. Ao CM1 có 3 nhóm vùng lặp lại trên bộ gen WSSV là 5, 7 và 9. Ao CM7 có hai nhóm vùng lặp lại là 5 và 9 vùng lặp lại trên bộ gen WSSV. Đây là hai ao thu ở hai thời điểm khác nhau (tháng 3 và tháng 5/2006) và ở hai địa điểm cách xa nhau hàng trăm kilomet (Tân thành và Cái Nước). Điều này cho thấy sự phân bố rộng của các kiểu gen WSSV.



Hình 3.2: Kết quả điện di sản phẩm PCR bằng gel agarose 2%. M: DNA marker, (-): đối chứng âm, (+): đối chứng dương. Giếng 1-6: mẫu phân tích ở ao CM1. Giếng 3, 4: 5 vùng lặp lại; giếng 5: 7 vùng lặp lại; giếng 1, 2, 6: 9 vùng lặp lại

Kết quả phân tích mẫu ở hai tỉnh Bạc Liêu và Cà Mau cho thấy sự đa dạng về các kiểu gen của WSSV ở từng thời điểm khác nhau và ở các vùng khác nhau. Điều này cho thấy sự cần thiết của việc nghiên cứu về dịch tễ học của bệnh đốm trắng trên tôm. Những hiểu biết về sự lan truyền và phân bố của WSSV ở khu vực địa lí khác nhau sẽ rất hữu ích trong việc phòng ngừa và kiểm soát sự lây lan của dịch bệnh virus đốm trắng trên tôm.

4 KẾT LUẬN

Kết quả thu được cho thấy: (i) số vùng lặp lại trên bộ gen WSSV ở các thời điểm thu mẫu và ở các khu vực địa lí khác nhau thì khác nhau. Trong cùng một ao tôm bệnh, số vùng lặp lại trên bộ gen WSSV thường giống nhau (16/19 ao phân tích); (ii) kiểu gen WSSV với 5 vùng lặp lại chiếm tỉ lệ cao nhất (48,8% ở Bạc Liêu và Cà Mau là 68,4%). Ở Bạc Liêu có 6 nhóm vùng lặp lại trên bộ gen của WSSV, từ 4 đến 16 vùng lặp lại. Ở Cà Mau có 3 nhóm vùng lặp lại trên bộ gen WSSV, từ 5 đến 9 vùng lặp lại; và (iii) kết quả ghi nhận khả năng sử dụng tốt của kỹ thuật PCR-genotyping (ORF94) trong việc phân biệt các dòng WSSV.

LỜI CẢM ƠN

Tác giả xin chân thành cảm ơn dự án “Bảo vệ và phát triển những vùng đất ngập nước ven biển” đã tài trợ nguồn kinh phí cho nghiên cứu và xin được cảm ơn Trung tâm khuyến ngư và một số hộ nuôi tôm của các Tỉnh Cà Mau, Bạc Liêu đã tạo điều kiện cho quá trình thu mẫu để hoàn thành nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bui Thi Minh Dieu, H. Marks, J. J. Siebenga, R. W. Golbach, D. Zuidema, T. P. Duong, and J. M. Vlak. 2004. Molecular epidemiology of *white spot syndrome virus* within Vietnam. *J Gen Virol* 85: 3607-3618.
- Flegel, T.W. 1997. Special topic review: Major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 13: 433-442.
- Tran Thi Tuyet Hoa, R. A. Hodgson, D. T. Oanh, N. T. Phuong, N. J. Preston, and P. K. Walker. 2005. Genotypic variations in tandem repeat DNA segments between ribonucleotide reductase subunit genes of *white spot syndrome virus* (WSSV) isolates from Vietnam. In P. Walker, R. Lester and M. G. Bondad-Reantaso (eds). *Diseases in Asian Aquaculture V.* pp.339-351. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila.
- Marks, H., R. W. Goldback, J. M. Vlak & M. C. W. van Hulten. 2004. Genetic variation among isolates of white spot syndrome virus. *Arch Virol* 149: 673-697.
- Van Hulten, M.C.W., J. Witteveldt, S. Peters, and N. Kloosterboer. 2001. The *white spot syndrome virus* DNA genome sequence. *Virology* 286: 7-22.
- Wang, C.K., C.F. Lo, T.H. Leu, C.M. Chou, P.Y. Yeh, H.Y. Chou, M.C. Tung, C.F. Chang, M.S. Su, and G.H. Kou. 1995. Purification and genomic analysis of baculovirus associated with *white spot syndrome virus* (WSSV) of *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms* 23: 239-242.
- Wongteerasupaya, C., P. Pungchai, B. Withyachumnamkul, V. Boonsaeng, S. Panyim, T.W. Flegel, and P.J. Walker. 2003. High variation in repetitive DNA fragment length for *white spot syndrome virus* (WSSV) isolates in Thailand. *Diseases of Aquatic Organisms* 54: 253-275.
- Withyachumnamkul, B. 1999. Results from black tiger shrimp *Penaeus monodon* culture ponds stocked with postlarvae PCR-positive or -negative for *white spot syndrome virus* (WSSV). *Diseases of Aquatic Organisms* 39: 21-27.
- Yang, F., J. He, X.H. Lin, Q. Li, D. Pan, X.B. Zhang & X. Xu. 2001. Complete genome sequence of the shrimp white spot bacilliform virus. *J Virol* 75: 11811 - 11820.