

PHÁT TRIỂN QUI TRÌNH PCR ĐA MÔI PHÁT HIỆN WHITE SPOT SYNDROME VIRUS (WSSV) VÀ *VIBRIO HARVEYI* NHIỄM TRÊN TÔM NUÔI

Hồng Mộng Huyền và Trần Thị Tuyết Hoa¹

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

Thông tin chung:

Ngày nhận: 10/6/2014

Ngày chấp nhận: 04/8/2014

Title:

Developing an mPCR procedure for the detection of White spot syndrome virus (WSSV) and *Vibrio harveyi* in infected cultured shrimp

Từ khóa:

mPCR, *Vibrio harveyi*, WSSV và tôm

Keywords:

mPCR, *Vibrio harveyi*, WSSV and shrimp

ABSTRACT

Intensive shrimp farming, compounded by climate change, has complicated the outbreak pattern and control of shrimp diseases, whose pathogen is mainly due to virus and bacteria groups belonging to *Vibrio* genus. In consequence, the infected shrimp had mass mortality within few days. Therefore, a rapid and highly specific diagnostic method is needed for early and accurate detection of the pathogen. A good candidate for such a method is the multiplex PCR procedure, which allows simultaneous detection of luminous bacteria (*Vibrio harveyi*) and white spot syndrome virus (WSSV) in shrimp farming. The procedure is based on the one-step PCR protocol, in which: primers F6, R4 designed from *vhh* gene, a specific gene of *Vibrio harveyi* (Sun et al., 2009) and primers P1, P2, P3, P4 of WSSV (Kimura et al., 1996). Experiment results showed that the total amplification time is approximately 3 hours, demonstrating that the mPCR procedure can be applied to simultaneously detect WSSV and luminous bacteria in infected shrimp in a time-effective manner.

TÓM TẮT

Thâm canh hóa nghề nuôi tôm cùng với sự tác động của biến đổi khí hậu dẫn đến tình hình dịch bệnh trên tôm diễn biến phức tạp và khó kiểm soát. Tác nhân gây bệnh chủ yếu do vi-rút và nhóm vi khuẩn thuộc giống *Vibrio*. Tôm nuôi nhiễm bệnh thường chết hàng loạt với tốc độ nhanh trong vòng vài ngày. Do đó, cần có những phương pháp chẩn đoán nhanh, tính đặc hiệu cao nhằm phát hiện sớm và đúng tác nhân gây bệnh. Quy trình PCR đa môi cho phép phát hiện đồng thời vi khuẩn gây bệnh phát sáng (*Vibrio harveyi*) và vi-rút gây bệnh đốm trắng (WSSV) trên tôm nuôi. Quy trình PCR đa môi được thiết kế dựa trên các quy trình PCR đơn sử dụng: đoạn môi F6, R4 thiết kế từ gen *vhh*, gen đặc trưng cho *Vibrio harveyi* (Sun et al., 2009) và đoạn môi P1, P2, P3, P4 của WSSV (Kimura et al., 1996). Kết quả cho thấy tổng thời gian khuếch đại khoảng 3 giờ, với quy trình này có thể ứng dụng để phát hiện đồng thời vi-rút gây bệnh đốm trắng và vi khuẩn gây bệnh phát sáng trên tôm trong thời gian ngắn.

1 GIỚI THIỆU

Bệnh phát sáng là tác nhân gây bệnh nghiêm trọng của nhiều đối tượng thủy sản, bệnh có thể lây lan và phát triển thành dịch. Một số loài vi khuẩn

có khả năng phát sáng như *Vibrio harveyi*, *V. splendidus*, *V. orientalis*, *V. fischer*. Trong đó *V. harveyi* đã được xác định là tác nhân gây bệnh phát sáng trên tôm sú (*Penaeus monodon*) (Pass et al., 1987). Ở Philippines công bố tác nhân gây bệnh

phát sáng trên tôm là do *Vibrio harveyi*, *V. splendidus*, trong đó *V. harveyi* chiếm ưu thế (Lavilla-Pitogo *et al.*, 1990). Bệnh có thể xuất hiện trên tất cả các giai đoạn ương nuôi từ trứng đến tôm trưởng thành. Bệnh gây thiệt hại lớn ở giai đoạn ấu trùng, hậu ấu trùng với tỉ lệ chết có thể lên đến 100%. *Vibrio* sinh sống và phát triển trong ruột tôm mẹ, do vậy sẽ dẫn đến việc lây nhiễm cho trứng, môi trường nước nuôi, là nguyên nhân dẫn đến lây lan mầm bệnh nhanh chóng.

Bệnh đốm trắng xuất hiện đầu tiên tại Đài Loan vào năm 1992 (Chou *et al.*, 1995), sau đó lan rộng ra nhiều nước trên thế giới (Escobedo Bonilla *et al.*, 2008). Bệnh có thể gây chết tôm, với tỉ lệ chết 100% trong vòng 3-10 ngày (Lightner, 1996). Giai đoạn đầu của quá trình lây nhiễm vi-rút đốm trắng xâm nhập vào dạ dày, mang, biểu bì, những mô liên kết của gan tụy. Ở giai đoạn sau WSSV tấn công vào cơ quan bạch huyết, tuyến anten, mô cơ, mô tạo máu, tim, đoạn ruột sau và một phần ruột giữa. Hệ thần kinh chỉ nhiễm ở giai đoạn cuối (Marks *et al.*, 2005). Vi-rút đốm trắng có khả năng tồn tại trong môi trường nước (phòng thí nghiệm) 30 ngày ở 30°C, trong ao 3 - 4 ngày, bị bất hoạt ở 50°C khoảng 120 phút, ở 60°C khoảng 1 phút và phát triển tốt nhất ở 30°C. Tôm ở giai đoạn hậu ấu trùng bị nhiễm WSSV khi gây cảm nhiễm ở 25°C trong vòng 20 giờ, WSSV có thể nhiễm mãn tính suốt đời vật chủ nếu như vật chủ khỏe mạnh và số lượng tác nhân gây bệnh không đáng kể (OIE, 2009).

Polymerase chain reaction (PCR) là kỹ thuật cho phép tạo ra một số lượng lớn đoạn DNA lựa chọn mà không cần tách và nhân dòng. Hiện nay, phương pháp PCR được ứng dụng rộng rãi trong ngành nuôi trồng thủy sản nhằm để kiểm tra chất lượng giống, chẩn đoán một số bệnh ở tôm, cá nuôi... Phương pháp cho kết quả nhanh và đáng tin cậy. Với đặc điểm gây bệnh có tỉ lệ chết cao, dễ lây lan và khó kiểm soát của bệnh đốm trắng và bệnh phát sáng, cần có qui trình giúp chẩn đoán nhanh, chính xác các tác nhân gây ra các bệnh này trên tôm nuôi. Do vậy, nghiên cứu phát triển qui trình PCR đa môi phát hiện đồng thời WSSV và *Vibrio harveyi* trên tôm nuôi là cần thiết nhằm rút ngắn thời gian phân tích và vẫn giữ khả năng phát hiện bệnh với độ chính xác cao.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Vật liệu nghiên cứu

Mẫu vật dùng cho nghiên cứu bao gồm các nguồn mẫu từ bộ sưu tập Khoa Thủy Sản: (i) Mẫu

DNA chiết tách từ tôm sú được xác định nhiễm WSSV; (ii) Mẫu vi khuẩn phân lập từ tôm sú đã được định danh là vi khuẩn *Vibrio harveyi* (T2007-05).

2.2 Phương pháp nghiên cứu

Ly trích DNA của *Vibrio harveyi*: Nuôi tăng sinh vi khuẩn (16-18 giờ) trong 5 ml NB có chứa 1,5% NaCl. Lấy 1,5 ml dung dịch vi khuẩn ly tâm 5.000 vòng/phút trong 5 phút ở 4°C rút bỏ phần dịch nổi, rửa viên kết tủa với 500 µl nước muối 0,9% NaCl và tiếp tục ly tâm, loại bỏ phần dịch nổi. Cho vào 100 µl nước cất tiệt trùng và ủ ở 100°C trong 10 phút. Ly tâm 12.000 vòng/phút trong 10 phút và lấy phần dịch nổi sử dụng cho phản ứng PCR (Pang *et al.*, 2006).

Ly trích DNA của WSSV: 50-100 g mẫu tôm (tôm bột hoặc mang của tôm thịt) vào ống eppendorf 1,5 ml có chứa 500 µl lysis buffer (50 mM Tris, 1 mM EDTA, 500 mM NaCl, 1% SDS, 10 µg/ml proteinase K). Nghiền nhuyễn mẫu và ủ ở nhiệt độ 100°C trong 10 phút. Để nguội, sau đó ly tâm 13.000 vòng/ phút trong 10 phút. Chuyển 100 µl dịch nổi sang ống eppendorf mới có chứa 200 µl ethanol 100%. Ly tâm 13.000 vòng/phút trong 10 phút, loại bỏ dịch nổi, lấy phần tủa DNA và để khô ở nhiệt độ phòng. Hòa tan phần viên với 500 µl TE buffer, trữ -20°C.

Qui trình PCR đa môi phát hiện đồng thời WSSV và *Vibrio harveyi*: Sử dụng các đoạn môi P1: 5'-ATCATGGCTGCTTCACAGAC-3', P2: 5'-CGCTGGAGAGGACAAGACAT-3', P3: 5'-TCTTCATCAGATGCTACTGC-3', P4: 5'-TAACGCTATCCAGTATCACG-3' phát hiện WSSV (Kimura *et al.*, 1996) và đoạn môi F6: 5'-TGGATGTAAATGAGTTTGG-3' và R4: 5'-CGTTACGATTATTTGATAG-3' phát hiện *Vibrio harveyi* (Sun *et al.*, 2009).

Qui trình được thiết kế bao gồm hai bước với các thành phần hóa chất tham gia phản ứng: (i) Bước 1: 1X PCR buffer, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs, 20 pmol mỗi P1 và mỗi P2, 10 pmol mỗi F6 và mỗi R4, 2,5U Taq DNA polymerase; 200 pg/µl DNA-WSSV, 200 pg/µl DNA-*Vibrio harveyi*, tổng thể tích cho phản ứng là 25 µl; (ii) Bước 2: 1X PCR buffer, 1 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs, 20 pmol mỗi P3 và mỗi P4, 10 pmol mỗi F6 và mỗi R4, 2,5U Taq DNA polymerase, 1 µl sản phẩm PCR bước 1 và tổng thể tích cho phản ứng là 25 µl.

Điều kiện phản ứng bước 1 và bước 2: 94°C trong 5 phút, tiếp theo 94°C trong 30 giây, 56°C

trong 30 giây, 72°C trong 1 phút chu kỳ này được lặp lại 30 lần, cuối cùng 72°C trong 5 phút.

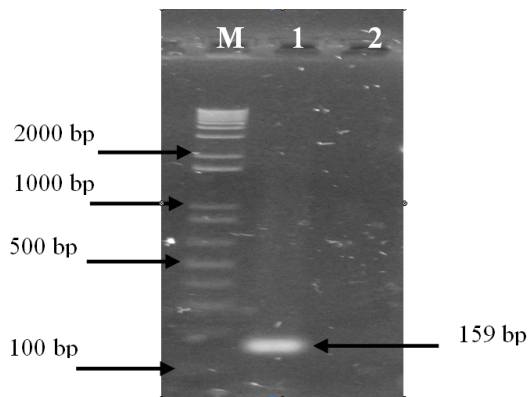
Điện di: Sản phẩm PCR được điện di bằng gel agarose 1,5% có chứa 0,5 µg/ml ethidium bromide, trong dung dịch 0,5X TAE (Tris-acetate-EDTA) ở 90V và ghi nhận với thiết bị chụp, xử lí ảnh geldoc XR (Biorad).

Đọc kết quả: Kích thước sản phẩm PCR được xác định dựa vào thang ADN 100bp (Promega) hoặc thang ADN 1kb plus (Invitrogen) với: (i) *Vibrio harveyi* có vạch sản phẩm 159 bp; (ii) WSSV (sản phẩm PCR bước 1) có vạch 982 bp hoặc WSSV (sản phẩm PCR bước 2) có vạch 570 bp.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Qui trình PCR đơn phát hiện vi khuẩn phát sáng *Vibrio harveyi*

Qui trình PCR đơn được thực hiện để khẳng định mẫu vi khuẩn dùng cho nghiên cứu là *Vibrio harveyi*. Kết quả điện di ở Hình 1 cho thấy sản phẩm PCR có kích thước 159 bp, đặc hiệu cho vi khuẩn *Vibrio harveyi*. Từ kết quả này có thể sử dụng chủng vi khuẩn T2007-05 cho quá trình chuẩn hóa qui trình mPCR phát hiện đồng thời *Vibrio harveyi* và WSSV. Bên cạnh đó, kết quả còn cho thấy qui trình PCR đơn có khả năng phát hiện vi khuẩn *Vibrio harveyi* gây bệnh phát sáng trên tôm sử dụng DNA ly trích từ vi khuẩn.



Hình 1: Kết quả PCR phát hiện *Vibrio harveyi*

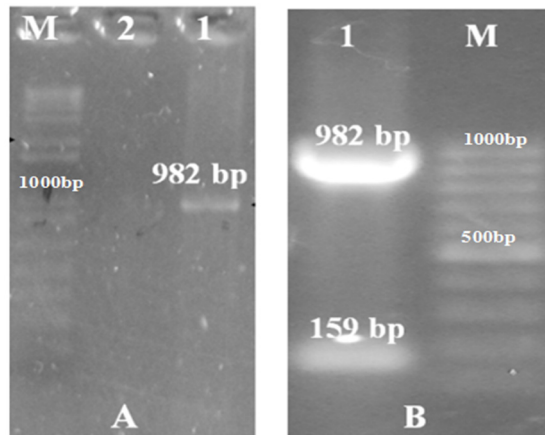
Giếng M: Thang đo DNA 1kb plus; Giếng 1: Mẫu dương tính với *Vibrio harveyi* (159bp); Giếng 2: Đối chứng âm

3.2 Qui trình mPCR phát hiện đồng thời WSSV và *Vibrio harveyi*

Qui trình mPCR bước 1 phát hiện đồng thời WSSV và *Vibrio harveyi*: Qui trình PCR phát hiện đồng thời WSSV và *Vibrio harveyi* bước đầu được xây dựng dựa vào nhiệt độ và thời gian gắn mồi

của WSSV, kết quả cho thấy băng gel chỉ hiện vạch của WSSV, không có vạch của *Vibrio harveyi* chứng tỏ đoạn gen mong muốn không được khuếch đại (Hình 2A).

Nhiệt độ gắn mồi 56°C không phù hợp cho DNA khuôn và mồi của *Vibrio harveyi* bắt cặp với nhau (Hình 2A) do vậy nhiệt độ gắn mồi được điều chỉnh thấp hơn là 54°C. Kết quả hình 4B cho thấy: khi nhiệt độ gắn mồi giảm xuống ở 54°C, qui trình khuếch đại cho sản phẩm có vạch sáng rõ không có sản phẩm không đặc hiệu (Hình 2B).



Hình 2: Kết quả mPCR bước 1 phát hiện đồng thời WSSV và *Vibrio harveyi*

(A) Nhiệt độ gắn mồi 56°C, (B) Nhiệt độ gắn mồi 54°C
Giếng M: Thang đo DNA; Giếng 1: Mẫu dương tính với WSSV (982 bp) và *Vibrio harveyi* (159 bp); Giếng 2: Đối chứng âm

Nhiệt độ gắn mồi có vai trò rất quan trọng trong phản ứng PCR, nếu sử dụng nhiệt độ không phù hợp trong giai đoạn khuếch đại sẽ dẫn đến việc đoạn mồi không gắn vào mạch khuôn hay gắn một cách tùy tiện dẫn đến không xuất hiện vạch sản phẩm hay xuất hiện các sản phẩm không đặc hiệu. Nếu sử dụng nhiệt độ gắn mồi quá cao sẽ có rất ít sản phẩm được tổng hợp, nguyên nhân là do sự bắt cặp của đoạn mồi bị giảm đồng thời và xuất hiện các sản phẩm không đặc hiệu do khuếch đại bất đối xứng giữa các đoạn sản phẩm (Quyền Đình Thi và Nông Văn Hải, 2008). Nhiệt độ gắn mồi tùy thuộc vào độ lớn và nhiệt độ nóng chảy của mồi. Như vậy, điểm điều chỉnh cần thiết ở qui trình PCR bước 1 là ở nhiệt độ gắn mồi giảm xuống còn 54°C so với qui trình như dự kiến ban đầu.

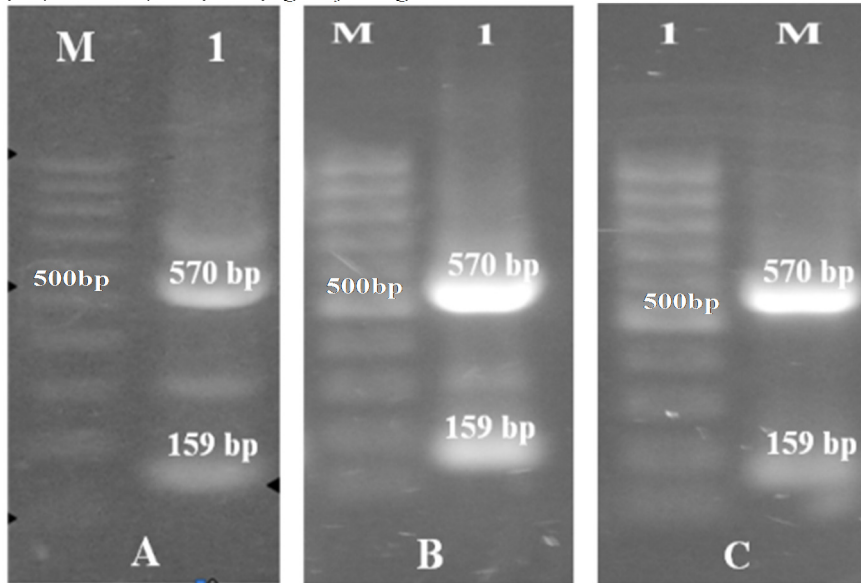
Như vậy, ở bước 1 thành phần hóa chất bao gồm 1X PCR buffer; 1,5 mM MgCl₂; 200 µM dNTPs; 20 pmol mồi P1 và mồi P2; 10 pmol mồi F6 và mồi R4; 2,5 U Taq DNA polymerase; 1µl

mẫu chiết tách (hay 200 ng/μl/phản ứng) và tổng thể tích cho 1 phản ứng là 25 μl. Điều kiện phản ứng: 94°C trong 5 phút; tiếp theo là 30 chu kỳ của 94°C trong 30 giây, 54°C trong 30 giây, 72°C trong 1 phút; cuối cùng 72°C trong 5 phút.

Qui trình mPCR bước 2 phát hiện đồng thời WSSV và *Vibrio harveyi*: Sử dụng sản phẩm bước 1 để làm khuôn cho thực hiện phản ứng bước 2.

Nhiệt độ gắn môi 54°C cho kết quả tốt ở bước 1 nhưng ở bước 2 lại xuất hiện các vạch sản phẩm không đặc hiệu (Hình 3A). Hiện tượng này cũng

xảy ra ở 55°C và sản phẩm phụ giảm về số vạch và độ sáng (Hình 3B). Việc giảm thấp nhiệt độ gắn môi có thể dẫn đến hiện tượng những nucleotide đơn bắt cặp nhầm hoặc môi gắn với trình tự khác đích (Quyền Đình Thi và Nông Văn Hải, 2008). Bên cạnh nhiệt độ gắn môi thì thời gian gắn môi, nồng độ Taq DNA polymerase, MgCl₂, dNTPs, nồng độ môi, nồng độ DNA,... không thích hợp sẽ ảnh hưởng đến tính đặc hiệu của phản ứng PCR. Do vậy, qui trình được điều chỉnh ở các thành phần phản ứng.



Hình 3: Kết quả mPCR bước 2 phát hiện đồng thời WSSV và *Vibrio harveyi*

(A) Nhiệt độ gắn môi 54°C, (B) Nhiệt độ gắn môi 55°C, (C) Chuẩn hóa thành phần phản ứng
Giếng M: Thang đo DNA; Giếng 1: Mẫu dương tính với WSSV (570 bp) và *Vibrio harveyi* (159 bp)

Qui trình lần lượt được thử nghiệm điều chỉnh: (i) ở thời gian gắn môi giảm từ 30 giây xuống 20 giây; (ii) giảm hàm lượng sản phẩm PCR bước 1 còn 0,5 μl; (iii) giảm nồng độ MgCl₂ 1,0 mM nhưng kết quả vẫn không tốt. Theo Quyền Đình Thi và Nông Văn Hải (2008), thời gian gắn môi dài cũng là nguyên nhân dẫn đến xuất hiện các sản phẩm không đặc hiệu. Đồng thời, nồng độ khuôn DNA cao thường tăng hiệu suất thu hồi sản phẩm PCR không đặc hiệu, nhưng nếu độ tin cậy tổng hợp là tới hạn, nên dùng nồng độ DNA khuôn tối đa cho phép cùng với số chu kỳ PCR giới hạn để tăng tỉ lệ sản phẩm PCR đặc hiệu. Ion Mg²⁺ có vai trò rất quan trọng trong phản ứng PCR ngoài vai trò xúc tác Taq DNA polymerase trong quá trình kéo dài môi và khuôn còn có tác dụng tạo sự bền hóa môi tương tác giữa oligo và khuôn, nhưng nếu nhiều ion Mg²⁺ làm tăng hiệu suất thu hồi sản

phẩm không đặc hiệu.

Môi là một trong những yếu tố quan trọng quyết định sự thành công của phản ứng PCR, môi phải được thiết kế đặc trưng cho trình tự cần khuếch đại, độ dài môi thường 15-30 nucleotide, lượng GC phải đạt 40-60%,... Tỉ lệ giữa môi và khuôn cao sẽ cho kết quả khuếch đại không đặc hiệu, tạo ra cấu trúc nhị phân môi. Do vậy, qui trình PCR bước 2 được thử nghiệm điều chỉnh giảm nồng độ môi xuôi P3, môi ngược P4 từ 20 pmol xuống 10 pmol. Kết quả ghi nhận ở hình 3C cho thấy qui trình cho phép khuếch đại cả vạch sản phẩm đặc hiệu của WSSV (570bp) và *Vibrio harveyi* (159bp). Các vạch sản phẩm sáng và rõ, đồng thời không còn các sản phẩm không đặc hiệu (Hình 3C). Do đó, khi giảm nồng độ môi từ 20 pmol xuống 10 pmol cho kết quả mong muốn và không còn sản phẩm không đặc hiệu (Hình 3C).

Kết quả chuẩn hóa thành phần hóa chất tham gia phản ứng bước 2 bao gồm: 1X PCR buffer; 1,0 mM MgCl₂; 200 μM dNTPs; 10 pmol mỗi P1 và mỗi P2; 10 pmol mỗi F6 và mỗi R4; 2,0 U Taq DNA polymerase; 0,5μl sản phẩm PCR bước 1 và tổng thể tích cho 1 phản ứng là 25 μl. Điều kiện phản ứng bước 2 bao gồm: 94°C trong 5 phút, tiếp theo lặp lại 30 lần của 94°C trong 30 giây, 55°C trong 20 giây, 72°C trong 1 phút, và cuối cùng 72°C trong 5 phút.

4 KẾT LUẬN

Qui trình PCR đa môi phát hiện đồng thời WSSV và *Vibrio harveyi* được phát triển và chuẩn hóa một số thành phần tham gia phản ứng như nồng độ MgCl₂, Taq DNA polymerase, môi, khuôn, nhiệt độ và thời gian gắn môi. Kết quả ghi nhận qui trình mPCR cho phép phát hiện đồng thời vi khuẩn gây bệnh phát sáng *Vibrio harveyi* và WSSV, giúp rút ngắn thời gian chẩn đoán và có tính chính xác cao. Do vậy, có thể ứng dụng các qui trình này vào trong chẩn đoán bệnh tôm giống, tôm nuôi một cách nhanh chóng, tính đặc hiệu cao.

LỜI CẢM ƠN

Tác giả xin cảm ơn sinh viên Bùi Thị Ngân, lớp Bệnh học Thủy sản K35 đã tham gia quá trình phân tích mẫu dùng trong nghiên cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Chen, L.L., J.H. Leu, C.J. Huang, C.M. Chou. 2002. Identification of a nucleocapsid protein (VP35) gene of shrimp white spot syndrome virus and characterization of the motif important for targeting VP35 to the nuclei of transfected insect cells. *Virology* 293: 44–53.
- Chou, H.Y., C.H. Wang, H.C. Chiang, C.F. Lo. 1995. Pathogenicity of a baculovirus infection causing White spot syndrome in culture penaeid shrimp in Taiwan. *Disease of Aquatic Organism* 23: 165-173.
- Escobedo-Bonilla, C.M., L.Audoorn, M. Wille, V. Alday-Sanz, P. Sorgeloos, M.B. Pensaert, H.J. Nauwynck. 2008. A review on the morphology, molecular characterization, morphogenesis and pathogenesis of white spot syndrome virus. *Journal of Fish Diseases* 31:1–18.
- Fukui, Y., T. Sawabe. 2007. Improved One-step Colony PCR detection of *Vibrio harveyi*. *Microbes Environment* 22(1):1-10.
- Kimura, T., Yamano K., Nakano H., Momoyama K., Hiraoka M., Inouye K. 1996. Detection of Penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV) by PCR. *Fish Pathology*. 31:93-98.
- Lightner, D.R. 1993. Diseases of penaeid shrimp. In: CRC handbook of mariculture. Crustacean aquaculture. 1:393-486.
- Lavilla-Pitogo, C.R., M.C.L. Baticados, E.R. Cruz-Lacierda, L.D. Dela-Pena. 1990. Occurrence of luminous bacterial disease of *Penaeus monodon* larvae in the Philippines. *Aquaculture*. 91: 1-13.
- OIE, 2009. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals.
- Marks, H., J.J.A. van Duijse, D. Zuidema, M.C.W. van Hulten, J.M. Vlak. 2005. Fitness and virulence of an ancestral White spot syndrome virus isolated from shrimp. *Virus Research* 110:9-20.
- Pang, L., X.H. Zhang, Y. Zhong, J. Chen, Y. Li, B. Austin. 2006. Identification of *Vibrio harveyi* using PCR amplification of the *toxR* gene. *Applied Microbiology* 43:249-255.
- Pass, D.A., R. Dybdahl, M.M. Mannion. 1987. Investigations into the causes of mortality of the pearl oyster, *Pinctada maxima* (Jamson), in Western Australia. *Aquaculture* 65:149-169.
- Quyền Đình Thi, Nông Văn Hải, 2008. Những kỹ thuật PCR và ứng dụng trong phân tích DNA Tập II. Nhà xuất bản Tự nhiên và Công nghệ. 1-494.
- Sun, K., Y.H. Hu, X.H. Zhang, F.F. Bai, L. Sun. 2009. Identification of *vhhP2*, a novel genetic marker of *Vibrio harveyi*, and its application in the quick detection of *V. harveyi* from animal specimens and environmental. *Applied Microbiology* 107:1251-1257.
- Van Hulten, M.C., T. Witteveld, S. Peters, N. Kloosterboer. 2001. The White spot syndrome virus DNA genome sequence. *Virology* 286:7-22.
- Yang, F., J. He, X. Lin, Q. Li, D. Pan, X. Zhang, X. Xu. 2001. Complete genome sequence of the shrimp white spot bacilli-form virus. *Journal of Virology* 75:11811–11820.