

ĐẶC ĐIỂM GEN CỦA VI RÚT GÂY BỆNH ĐỐM TRẮNG (WHITE SPOT SYNDROME VIRUS) PHÂN LẬP TỪ HỆ THỐNG NUÔI TÔM SÚ QUẢNG CANH CẢI TIẾN

Trần Thị Tuyết Hoa¹, Mai Nam Hưng và Đặng Thị Hoàng Oanh¹

ABSTRACT

Investigating the genetic variability among natural WSSV populations is a novel approach to understand the epidemiologic characteristics of this virus. We characterized the number of repeat units (RUs) located in the variable number of tandem repeat regions (VNTRs) of ORF75, ORF94 and ORF125 (WSSV-TH strain; van Hulsten et al., 2001) from 326 WSSV-DNA samples collected from 29 improved-extensive shrimp ponds. The results showed that: (i) there are 16 genotypes determined in ORF94, ranging from 3 to 18 repeat units (RUs). In which, the 10RUs (20,6%) and 11RUs (19,8%) were the most common genotypes; (ii) In ORF125, there are 14 genotypes, ranging from 3 to 17RUs. The most common genotype was 7RUs (24,9%); (iii) the compound repeat region of ORF75 displayed 10 different patterns of repeat. The pattern with 500bp was the most prevalence (51%). In the study, the obtained results suggest that different WSSV genotypes exist in the improved-extensive shrimp farming system. Tandem repeat sequence in ORF94, followed by ORF125 and ORF75 could be used to discriminate WSSV isolates in improved extensive systems.

Keywords: white spot syndrome virus, molecular marker, ORF75, ORF94, ORF125

Title: Genotyping of white spot syndrome virus isolates from improved-extensive black tiger shrimp farming systems

TÓM TẮT

Khảo sát sự đa dạng về đặc điểm gen của vi rút gây bệnh đốm trắng (WSSV) ngoài tự nhiên là một trong những phương pháp tiếp cận giúp hiểu rõ hơn về các đặc điểm dịch tễ học của loài vi rút này. Nghiên cứu phân tích số lượng của các đơn vị lặp lại (RU) nằm trên các vùng lặp lại liên kế khác nhau (VNTR) của ORF75, ORF94 và ORF125 (WSSV-TH strain; van Hulsten et al., 2001) từ 326 mẫu WSSV-DNA thu từ 29 ao tôm quảng canh cải tiến. Kết quả cho thấy: (i) ORF94 xác định được 16 nhóm kiểu gen WSSV, từ 3VLL đến 18VLL. Trong đó, kiểu gen có 10 VLL (20,6%) và 11 VLL (19,8%) là những kiểu gen phổ biến nhất. (ii) Ở ORF125, hiện diện 14 nhóm kiểu gen WSSV, từ 3 VLL đến 17 VLL. Trong đó, 7 VLL là kiểu gen chiếm ưu thế (24,9%); (iii) Ở ORF75, vùng lặp lại kép này có 10 kiểu gen được ghi nhận, trong đó 500bp là sản phẩm khuếch đại được phát hiện nhiều nhất (51%). Trong nghiên cứu này, kết quả cho thấy sự tồn tại của nhiều kiểu gen WSSV khác nhau trong mô hình nuôi tôm sú quảng canh cải tiến. Vùng lặp lại liên kế ở ORF94, kế đó là ORF125 và ORF75 có thể được sử dụng để phân biệt các dòng WSSV phân lập từ mô hình quảng canh cải tiến.

Từ khoá: vi-rút gây bệnh đốm trắng, chỉ thị phân tử, ORF75, ORF94, ORF125

1 GIỚI THIỆU

Bệnh đốm trắng do White spot syndrome virus (WSSV) gây ra trên tôm được phát hiện sớm nhất ở Đài Loan năm 1992, sau đó WSSV được ghi nhận phân bố rộng khắp các khu vực nuôi tôm trên thế giới (Lightner, 1996). WSSV gây bệnh trên

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

tôm nước mặn, tôm nước ngọt và được phát hiện nhiễm trên nhiều đối tượng khác nhau (OIE, 2009). Từ khi bệnh xuất hiện đến nay có rất nhiều nghiên cứu tìm hiểu về phương thức lan truyền, vật chủ cảm nhiễm, độc lực, thành phần cấu tạo và đặc biệt đã giải trình tự bộ gen ba dòng WSSV khác nhau phân lập từ Đài Loan, Trung Quốc và Thái Lan (OIE, 2009). Khi so sánh 3 trình tự gen này với nhau, sự thay đổi về số vùng lặp lại thuộc ORF75, ORF94 và ORF125 trên 3 dòng vi rút này đã được phát hiện (Marks *et al.*, 2005). Nhiều nghiên cứu cho thấy vai trò ứng dụng của ba vùng lặp lại này trong việc xác định được nguồn gốc của WSSV ở Việt Nam (Dieu *et al.*, 2004), ở Ấn độ (Pradeep *et al.*, 2008); phạm vi lan truyền của bệnh từ nơi phát sinh (Zwart *et al.*, 2010) và sự khác nhau giữa các dòng WSSV (Woogterasupaya *et al.*, 2003). Do đó, các vùng lặp lại thuộc ORF75, ORF94 và ORF125 có ý nghĩa quan trọng trong nghiên cứu về dịch tễ học của WSSV. Trong nghiên cứu này, ba vùng ADN lặp lại thuộc các vùng mã hóa ORF75, ORF94 và ORF125 được chọn để làm chỉ thị phân tử cho việc tìm hiểu về đặc điểm gen của các dòng WSSV thu được từ các ao nuôi tôm sú mô hình quảng canh cải tiến.

2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Vật liệu nghiên cứu

Tổng số 326 mẫu WSSV dùng trong nghiên cứu được phân lập từ 391 mẫu tôm sú thu ở 29 ao nuôi tôm quảng canh cải tiến thuộc huyện Cái Nước và Thới Bình, Cà Mau trong khoảng thời gian từ tháng 8/2008 đến tháng 9/2009. Mẫu tôm thu được bảo quản trong nơ lỏng hoặc cồn tuyệt đối (Merck) và chuyển sang trữ ở nhiệt độ đông sâu -80°C cho đến khi phân tích. Các thông tin về 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 (mang tôm) 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 GeneReach Biotechnology Corp., Đài Loan).

2.3 Phương pháp PCR-genotyping

2.3.1 Khuếch đại vùng lặp lại thuộc ORF75

Qui trình PCR-genotyping khuếch đại vùng lặp lại kép 45bp và 102bp thuộc ORF75 được thực hiện với thành phần phản ứng gồm có 1 μl DNA mạch khuôn; 1X PCR buffer; 1,5mM MgCl_2 ; 10mM dNTPmix; 2,0U *Taq*DNA polymerase (Promega); 20pmol mỗi ORF75 flank-Forward và 20pmol mỗi ORF75 flank-Reverse (Bảng 1). Điều kiện phản ứng bao gồm các bước 94°C trong 30 giây, 49°C trong 30 giây, 72°C trong 30 giây. Lặp lại 30 chu kỳ và cuối cùng là kéo dài ở 72°C trong 10 phút.

2.3.2 Khuếch đại vùng lặp lại thuộc ORF94

Qui trình PCR-genotyping khuếch đại vùng lặp lại 54bp thuộc ORF94 được thực hiện với thành phần phản ứng gồm có 1 μl DNA mạch khuôn; 1X PCR buffer; 2mM MgCl_2 ; 10mM dNTPmix; 2,5U *Taq*DNA polymerase (Promega); 25 pmol mỗi ORF94-F và 25 pmol mỗi ORF94-R (Bảng 1).

Điều kiện phản ứng bao gồm các bước 94°C trong 20 giây, 60°C trong 20 giây, 72°C trong 1 phút. Lặp lại 40 chu kỳ và cuối cùng là kéo dài ở 72°C trong 10 phút.

Bảng 1: Trình tự mỗi sử dụng trong các phản ứng PCR-genotyping

Tên mỗi	Trình tự (5' - 3')	Nguồn
ORF75 flank - Forward	GAAGCAGTATCTCTAACAC	Dieu et al., 2004
ORF75 flank - Reverse	CAACAGGTGCGTAAAAGAAG	Dieu et al., 2004
ORF94-F	TCTACTCGAGGAGGTGACGAC	Wongteerasupaya et al., 2003
ORF94-R	CATGAAATGTGTACACACCTG	Wongteerasupaya et al., 2003
ORF125 flank - Forward	CGAAATCTTGATATGTTGTGC	Dieu et al., 2004
ORF125 flank - Reverse	CCATATCCATTGCCCTTCTC	Dieu et al., 2004

2.3.3 Khuếch đại vùng lặp lại thuộc ORF125

Qui trình PCR-genotyping khuếch đại vùng lặp lại 69bp thuộc ORF125 được thực hiện với thành phần phản ứng gồm có 1µl DNA mạch khuôn; 1X PCR buffer; 1,5mM MgCl₂; 10mM dNTPmix; 2,0U TaqDNA polymerase (Promega); 20pmol mỗi ORF125 flank-Forward và 20pmol mỗi ORF125 flank-Reverse (Bảng 1).

Điều kiện phản ứng bao gồm các bước 94°C trong 30 giây, 52°C trong 30 giây, 72°C trong 30 giây. Lặp lại 35 chu kỳ và cuối cùng là kéo dài ở 72°C trong 10 phút.

Sản phẩm PCR-genotyping được điện di bằng gel 2% agarose 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 (Geldoc XR - Biorad). Kích thước sản phẩm PCR được xác định dựa vào thang ADN 100bp plus (Promega).

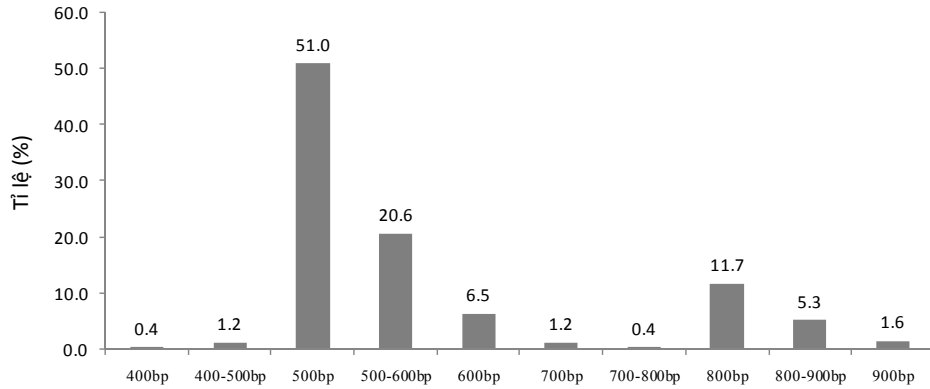
3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Đặc điểm của vùng lặp lại thuộc ORF75 trên các mẫu tôm sú thu ở mô hình nuôi tôm quảng canh cải tiến ở Cà Mau

Phương pháp PCR-genotyping, sử dụng cặp mỗi ORF75-flank Forward và ORF75-flank Reverse cho thấy có sự khác nhau về số vùng lặp lại trên bộ gen của WSSV trong tổng số 238 mẫu WSSV chiết tách từ tôm nuôi trong mô hình quảng canh cải tiến. Kết quả cho thấy có 10 nhóm vùng lặp lại khác nhau của kiểu vùng lặp lại kép 45bp và 102bp. Trong đó, số mẫu có vùng lặp lại với sản phẩm khuếch đại 500bp chiếm tỉ lệ cao nhất xấp xỉ 51% (126/247 mẫu), thấp nhất là các kiểu vùng lặp lại với sản phẩm khuếch đại khoảng 400bp (1/247 mẫu), 400-500bp (3/247 mẫu), 700bp (3/247 mẫu), 700-800bp (1/247 mẫu) và 900bp (4/247 mẫu). Đặc biệt, kiểu vùng lặp lại với sản phẩm khuếch đại khoảng 700bp (phát hiện chỉ ở 1 trong số 247 mẫu phân tích) là kiểu vùng lặp lại được phát hiện trong nghiên cứu của Dieu et al. (2004) khi nghiên cứu trên mẫu tôm sú thu tại khu vực miền Trung, Việt Nam (Hình 1). Ngoài ba kiểu gen 400-500bp, 500bp và 500-600bp các kiểu

gen còn lại chưa được ghi nhận trong mô hình nuôi tôm bán thâm canh thu từ vùng nuôi tôm Tỉnh Bạc Liêu (Trần Thị Tuyết Hoa *et al.*, 2011).

Kết quả phân tích cho thấy, số vùng lặp lại kép thuộc ORF75 trên bộ gen của WSSV thu được ở các ao nuôi tôm sú quảng canh cải tiến có dãy phân bố rất rộng với 10 kiểu vùng lặp lại khác nhau. Như vậy, có thể kết luận rằng kiểu gen WSSV với kiểu vùng lặp lại với sản phẩm khuếch đại 500bp là phổ biến ở các ao nuôi tôm sú quảng canh cải tiến khu vực Cà Mau. Chỉ thị ORF75 có thể sử dụng để phân biệt các dòng WSSV thu từ mô hình nuôi tôm quảng canh cải tiến.



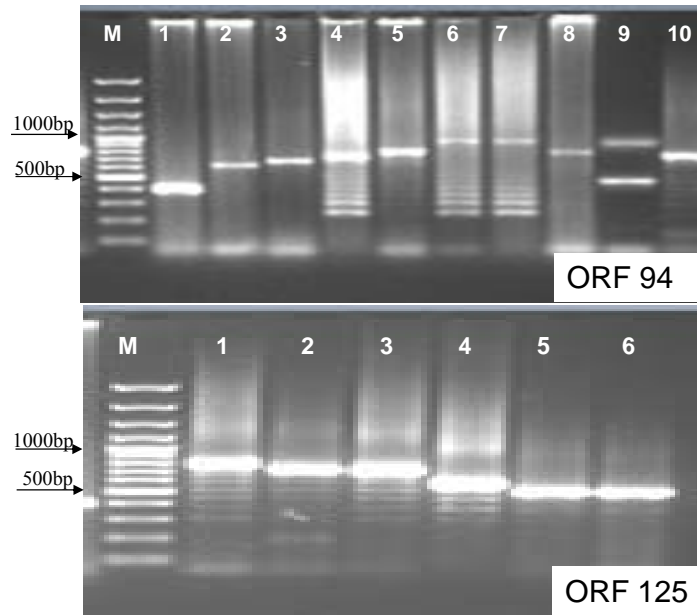
Hình 1: Tỷ lệ phần trăm về số vùng lặp lại thuộc ORF75 thu từ mô hình nuôi tôm sú quảng canh cải tiến thuộc khu vực Cà Mau

3.2 Đặc điểm của vùng lặp lại thuộc ORF94 trên các mẫu tôm sú thu ở mô hình nuôi tôm quảng canh cải tiến ở Cà Mau

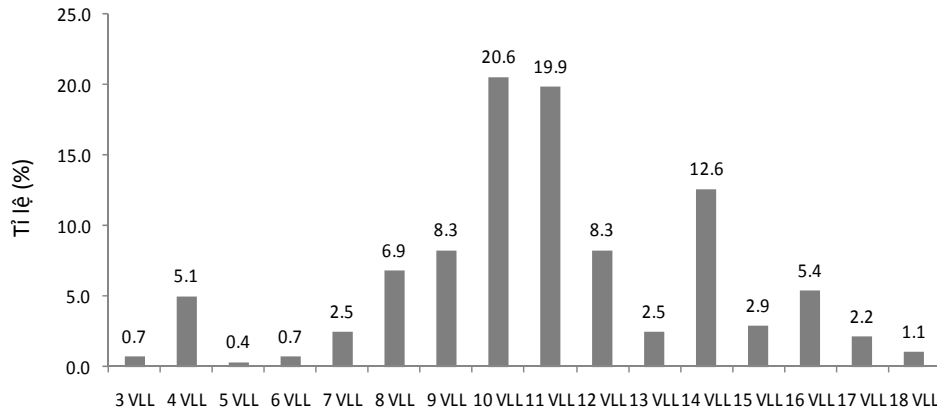
Bằng phương pháp PCR-genotyping sử dụng cặp mồi ORF94-F và ORF94-R (Woongterasupaya *et al.*, 2003) cho thấy có sự khác biệt về số vùng lặp lại thuộc ORF94 trên bộ gen WSSV giữa các mẫu thu được từ mô hình quảng canh cải tiến (Hình 2). Kết quả PCR-genotyping khuếch đại vùng lặp lại thuộc ORF94 trên các mẫu tôm thu tại Cà Mau đã xác định được 16 kiểu gen WSSV tương ứng với 3 cho đến 18 vùng lặp lại (Hình 3). Trong đó kiểu gen chứa 10 VLL (20,6%) và 11 VLL (19,9%) chiếm tỷ lệ cao nhất so với các kiểu gen khác.

Dựa vào chỉ thị phân tử ORF94, sự đa dạng về kiểu gen WSSV cũng được ghi nhận qua nhiều nghiên cứu khác nhau từ Thái Lan (Woongterasupaya *et al.*, 2003), Ấn độ (Pradeep *et al.*, 2008), Châu Mỹ La tinh (Muller *et al.*, 2010). Sự đa dạng về kiểu gen của WSSV trong mô hình quảng canh cải tiến có điểm tương đồng về sự đa dạng kiểu gen của WSSV phân lập từ hệ thống nuôi tôm sú thâm canh (Trần Thị Tuyết Hoa *et al.*, 2011). Tuy nhiên, kiểu gen có 10 và 11 VLL là phổ biến trong mô hình quảng canh cải tiến thì kiểu gen có 7 VLL lại chiếm tỷ lệ vượt trội trong mô hình nuôi tôm bán thâm canh (Trần Thị Tuyết Hoa *et al.*, 2011).

Kết quả nghiên cứu cho thấy, kiểu gen của các dòng WSSV phân lập tại các ao nuôi quảng canh cải tiến khu vực Cà Mau có sự đa dạng rất cao. Các kiểu gen được phân lập tại địa bàn nghiên cứu đều được ghi nhận hiện diện ở hầu hết các vùng nuôi tôm của nhiều quốc gia trên thế giới, Trung Quốc (Tan và Shi, 2011), Ấn độ (Pradeep *et al.*, 2008), Thái Lan (Woongterasupaya *et al.*, 2003), Braxin, Mỹ (Muller *et al.*, 2010).



Hình 2: Kết quả điện di sản phẩm PCR-genotyping (ORF75, ORF94, ORF125) bằng gel 2% agarose



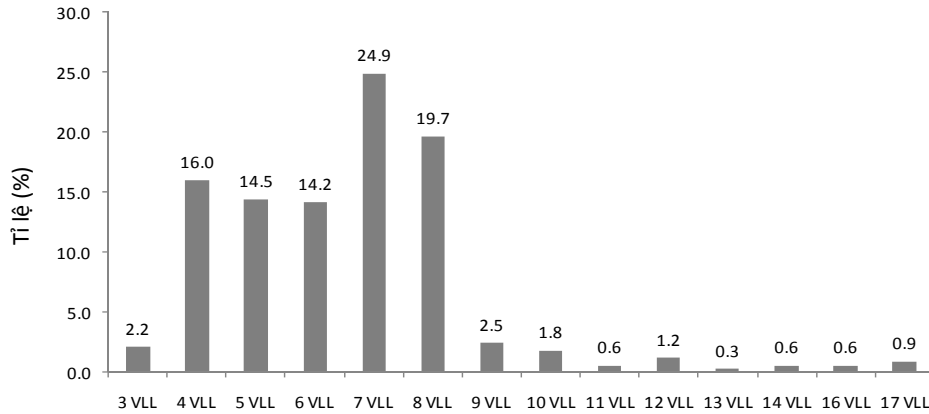
Hình 3: Tỉ lệ phần trăm về số vùng lặp lại thuộc ORF94 thu từ mô hình nuôi tôm sú quảng canh cải tiến khu vực Cà Mau

3.3 Đặc điểm của vùng lặp lại thuộc ORF125 trên các mẫu tôm sú thu ở mô hình nuôi tôm quảng canh cải tiến ở Cà Mau

Kết quả khuếch đại đoạn gen của WSSV có trình tự lặp lại là 69 bp thuộc ORF125 cho thấy có 14 kiểu vùng lặp lại khác nhau từ 3 đến 17 VLL (Hình 4) thu được từ mô hình nuôi tôm quảng canh cải tiến. Trong đó, số vùng lặp lại có tần số xuất hiện cao nhất là 7 VLL chiếm 24,9%. Với chỉ thị phân tử ở ORF125, đa số các dòng WSSV phân lập từ các ao quảng canh cải tiến đều chiếm tỉ lệ cao ở khoảng từ 4 VLL cho đến 8 VLL (Hình 4). Kết quả ghi nhận từ mô hình nuôi tôm bán thâm canh khu vực Bạc Liêu cũng phát hiện số vùng lặp lại ở ORF125 đạt tỉ lệ cao ở 5, 6, 7, 8VLL (Trần Thị Tuyết Hoa *et al.*, 2011). Qua đó cho thấy các kiểu gen

có 5, 6, 7, 8VLL ở chi thị phân tử thuộc ORF125 là phổ biến ở hai vùng nuôi tôm Bạc Liêu và Cà Mau.

So với nghiên cứu trước đây, sự đa dạng về số vùng lặp lại thuộc ORF125 cũng được ghi nhận từ nhiều dòng WSSV phân lập từ nhiều vùng nuôi tôm ở các quốc gia khác nhau trên thế giới, cụ thể là WSSV-Mexico (7 VLL), WSSV-Brazin (8 VLL và 9 VLL), WSSV-Mỹ (10 VLL và 11 VLL) (Muller *et al.*, 2010). Riêng ở Việt Nam, sự đa dạng của WSSV cũng ghi nhận từ mẫu tôm thu ở mô hình nuôi bán thâm canh với 11 kiểu vùng lặp lại được phân biệt nhờ vào chi thị phân tử ở ORF125 (Trần Thị Tuyết Hoa *et al.*, 2011).



Hình 4: Tỉ lệ phần trăm về số vùng lặp lại thuộc ORF125 thuộc mô hình nuôi tôm sú quảng canh cải tiến khu vực Cà Mau

Ngoài ra khi so sánh với nghiên cứu về đặc điểm gen của WSSV ở mô hình bán thâm canh (Trần Thị Tuyết Hoa *et al.*, 2011) cho thấy có sự khác biệt về số lượng và tỉ lệ nhiễm giữa các kiểu gen WSSV. Cụ thể, kiểu gen WSSV ở 2 mô hình này khác nhau khá lớn: (i) ở ORF75 khác nhau về số loại kiểu gen – 3 kiểu ghi nhận ở mô hình bán thâm canh so với 10 kiểu ở mô hình quảng canh cải tiến; (ii) ORF94 có sự khác biệt về tỉ lệ nhiễm - kiểu gen thuộc ORF94 chiếm ưu thế ở mô hình quảng canh cải tiến là 10 và 11 VLL, trong khi 7 VLL là kiểu gen chiếm tỉ lệ cao mô hình nuôi bán thâm canh; (iii) không có sự khác biệt lớn về số lượng và tỉ lệ nhiễm đối với chi thị phân tử ORF125 giữa hai mô hình.

Dựa vào các chi thị phân tử thuộc ORF75, ORF94, ORF125 cho thấy sự đa dạng về các kiểu gen của WSSV trong mô hình nuôi tôm sú quảng canh cải tiến thuộc khu vực Cà Mau. Sự khác biệt này có khả năng liên quan đến khả năng gây chết tôm của vi rút (Marks *et al.*, 2005; John *et al.*, 2010), sự khác biệt của vật chủ cảm nhiễm (Musthaq *et al.*, 2006). Điều này cho thấy sự cần thiết của việc nghiên cứu về đặc điểm gen của vi rút gây bệnh đốm trắng trên tôm. Qua đó, cho thấy khả năng ứng dụng của ba chi thị này trong nghiên cứu các đặc điểm dịch tễ học của bệnh đốm trắng. Những hiểu biết về các đặc điểm dịch tễ của bệnh sẽ rất hữu ích trong việc xây dựng qui trình phòng ngừa và kiểm soát sự lây lan của dịch bệnh đốm trắng trên tôm.

4 KẾT LUẬN

Chi thị phân tử là số vùng lặp lại thuộc ORF75, ORF94 và ORF125 thuộc hệ gen của WSSV cho thấy sự đa dạng giữa các dòng WSSV phân lập từ hệ thống nuôi tôm sú quảng canh cải tiến ở Cà Mau. Trong hệ thống nuôi tôm sú quảng canh cải tiến, cả ba chi thị phân tử ORF75, ORF94 và ORF125 đều có ứng dụng tốt trong việc phân biệt các dòng WSSV.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Dieu BTM, Marks H, Siebenga J, Goldbach R, Zuidema D, Duong TP, Vlak JM (2004) Molecular epidemiology of white spot syndrome virus within Vietnam. *J. Gen. Virol.* 85: 3607–3618.
- Hoa TTT, Hodgson RA, Oanh DT, Phuong NT, Preston NJ, Walker PJ (2005) Genotypic variations in tandem repeat DNA segments between ribonucleotide reductase subunit genes of white spot syndrome virus (WSSV) isolates from Vietnam. In: *Diseases in Asian aquaculture V*. Fish Health Sect, Asian Fish Soc, Manila, p. 339–351.
- John KR, George MR, Iyappan T, Thangarani AJ, Jeyaseelan MJP (2010) Indian isolates of white spot syndrome virus exhibit variations in their pathogenicity and genomic tandem repeats. *J. Fish Dis.* 33: 749–758.
- Lightner DV (1996) A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. World Aquatic Society, Baton Rouge, LA.
- Marks H, Goldbach RW, Vlak JM, van Hulten MCW (2004) Genetic variation among isolates of white spot syndrome virus. *Arch. Virol.* 149: 673–697.
- Marks H, van Duijse JJA, Zuidema D, van Hulten MCW, Vlak JM (2005) Fitness and virulence of an ancestral white spot syndrome virus isolate from shrimp. *Virus Res.* 110: 9–20.
- Muller IC, Andrade TP, Tang-Nelson KF, Marques MR, Lightner DV (2010) Genotyping of white spot syndrome virus (WSSV) geographical isolates from Brazil and comparison to other isolates from the Americas. *Dis. Aquat. Org.* 88: 91–98.
- Musthaq SS, Sudhakaran R, Ahmed IVP, Balasubramanian G, Hameed SAS (2006) Variability in the tandem repetitive DNA sequence of white spot syndrome virus (WSSV) genome and stability of VP28 gene to detect different isolates of WSSV from India. *Aquaculture* 256: 34–41.
- OIE (2009) International Aquatic Animal Health Code. 12th edition. OIE, Paris.
- Pradeep B, Shekar M, Gudkovs N, Karunasagar I, Karunasagar I (2008a) Genotyping of white spot syndrome virus prevalent in shrimp farms of India. *Dis. Aquat. Org.* 78: 189–198.
- Tan Y, Shi Z (2011) Genotyping of white spot syndrome virus in Chinese cultured shrimp during 1998–1999. *Virol. Sin.* 26: 123–130.
- Trần Thị Tuyết Hoa, Đào Bá Cường, Nguyễn Thanh Phương. 2011. Đặc điểm gen của vi-rút gây bệnh đốm trắng (white spot syndrome virus - WSSV) phân lập từ hệ thống nuôi tôm sú (*Penaeus monodon*) bán thâm canh. *Kỷ yếu hội nghị khoa học thủy sản lần 4*. trang 212 – 220.
- van Hulten MCW, Witteveldt J, Peters S, Kloosterboer N, Tarchini R, Fiers M, Sandbrink H, Lankhorst RK, Vlak JM (2001a) The white spot syndrome virus DNA genome sequence. *Virology* 286: 7–22.
- Wongteerasupaya C, Pungchai P, Withyachumnarnkul B, Boonsaeng V, Panyim S, Flegel TW, Walker PJ (2003) High variation in repetitive DNA fragment length for white spot syndrome virus (WSSV) isolates in Thailand. *Dis. Aquat. Org.* 54: 253–257.
- Zwart MP, Dieu BTM, Hemerik L, Vlak JM (2010a) Evolutionary trajectory of white spot syndrome virus (WSSV) genome shrinkage during spread in Asia. *PLoS ONE* 5(10): e13400.