

2014 年中国不同地区对虾白斑综合征病毒 ORF14/15 和 ORF23/24 缺失区序列比较*

孙新颖^{1,3} 刘庆慧^{1,2①} 万晓媛^{1,2} 黄 健^{1,2}

(1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071;

2. 青岛海洋科学与技术国家实验室 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071;

3. 上海海洋大学 上海 201306)

摘要 对虾养殖面临诸多病害威胁,对虾白斑综合征病毒(White spot syndrome virus, WSSV)是养殖对虾主要病原之一, WSSV 不同地理株的变异可能导致 WSSV 毒力的变化。为了解 2014 年中国大部分地区 WSSV ORF14/15 和 ORF23/24 的变异情况,本研究选择 2014 年 1 月–8 月期间采集的 48 份 WSSV 阳性样本,用特异引物扩增 ORF14/15 和 ORF23/24 片段,连接于 T 载体,转化至 Top10 中,筛选阳性克隆,测序分析不同样本之间的缺失差异。结果显示,能够扩增 ORF14/15 和 ORF23/24 样品的比例分别为 43.75%和 33.33%。在 ORF14/15 扩增中,分别扩增出 1260 bp、1270 bp、1892 bp 和 2662 bp 片段,与 TH-96-II 比对共有 4 种缺失情况,即缺失 6540 bp、6530 bp、5908 bp 和 5138 bp。而在 ORF23/24 扩增中,分别扩增出 1140 bp 和 1146 bp 片段,与中国台湾株(TW)比对有两种缺失情况,即缺失 12070 bp 和 12064 bp。研究结果表明, WSSV 在中国大部分地区存在一定程度的变异,而不同毒株之间在 ORF14/15 可变区差异比较明显,在 ORF23/24 可变区差异不大,但均具有大片段缺失。

关键词 WSSV; ORF14/15; ORF23/24; 序列分析

中图分类号 S945 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)04-0140-07

对虾白斑综合征病毒(White Spot Syndrome Virus, WSSV)作为线头病毒科(Nimaviridae)、白斑病毒属(Whispovirus)的唯一成员(Vlak *et al.*, 2005),由其引起的白斑病已经成为对虾养殖中面临的最主要病害。在 1991–1992 年间, WSSV 首次被报道发现于中国台湾,之后迅速影响至东南亚其他地区(Flegel, 1997),而在 1994 年,在印度等南亚地区病害也呈暴发趋势(Anonymous, 1995; Pradeep *et al.*, 2008)。WSSV 自此开始在全球对虾养殖业中迅速传播,在过去的几十年中,对很多国家的对虾养殖产生很大的影响(Inouye *et al.*, 1994; Chou *et al.*, 1995; Cai *et al.*, 1995; Wongteerasupaya *et al.*, 1995; Kasornchandra *et al.*, 1998; Mohan *et al.*, 1998;

Nadala *et al.*, 1998; Park *et al.*, 1998; Magbanua *et al.*, 2000), 3–10 d 内可达 100%的致死率,造成巨大的经济损失(Lightner, 1996)。

目前, GenBank 上公布有 4 种不同 WSSV 病毒株的基因组全序列,分别是中国台湾株(TW, AF440570) (307287 bp)、泰国株(TH, AF369029) (292967 bp)、中国株(CN, AF332093) (305107 bp)和韩国株(KR, JX515788)。据报道,假定的祖先株约 312 kb,最大基因组的 WSSV-TH-96-II (AY753327)则起源于泰国株(Pradeep *et al.*, 2008)。各种基因组序列之间具有高度的相似度,而其差异主要体现在五个方面:大序列缺失;易于发生基因重组的可变区;同源重复区内重复

* 国家重点基础研究发展计划(2012CB114401)、山东省“泰山学者”建设工程专项经费和农业部科研杰出人才和创新团队专项经费共同资助。孙新颖, E-mail: sxy16@163.com

① 通讯作者: 刘庆慧, 研究员, E-mail: liuqh@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2015-05-27, 收修改稿日期: 2015-06-29

序列的变化; 转座酶基因序列只存在于中国台湾株; 单核苷酸突变(童桂香等, 2014; Marks *et al.*, 2004)。

由于 WSSV 地理范围、宿主类别和致病力的差异, 导致不同的毒株之间具有差异。通过对 WSSV 基因组两多态性位点分析, ORF14/15 和 ORF23/24 更易于发生缺失和重组。据此, 本研究针对中国明对虾养殖不同地区自 2014 年 1 月-8 月间采集的 48 份 WSSV 阳性样本, 通过特定引物扩增目的片段, 测序分析比较不同地区各分离株 ORF14/15 和 ORF23/24 序列缺失情况, 探究中国不同地区 WSSV 分离株 ORF14/15 和 ORF23/24 的变异, 为 WSSV 分子流行病学研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 样本来源

在 2014 年 1 月-8 月 WSSV 病害暴发期间, 赴河北、浙江、山东、江苏、辽宁、福建和广东等地采集对虾样品, 然后置于 -20°C 的冰箱冷冻保存, 其来源信息见表 1。

1.2 WSSV 核酸提取

将保存的样本取出, 取约 30 mg 鳃组织, 按照海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱型)的说明进行 DNA 提取, 最后加 30 μl 65°C 预热的无菌水溶解, 将提取的 DNA 样本置于 -20°C 冷冻保存待用。

1.3 PCR 检测

对 WSSV DNA 样本的检测采用套式 PCR 方法, 标准按照 GB/T 28630.2-2012 白斑综合征(WSD)诊断规程第 2 部分套式 PCR 检测法。PCR 产物通过用 $1\times\text{TAE}$ 电泳缓冲液配制的 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳分析。

1.4 WSSV 缺失区 ORF14/15 和 ORF23/24 扩增

将得到的 WSSV 核酸通过特定的引物进行 ORF14/15 和 ORF23/24 目的片段的扩增。实验中 25 μl 的体系包括: 17.3 μl 双蒸水, 2 μl 脱氧核酸混合物, 2.5 μl $10\times\text{PCR}$ 反应缓冲液(含 Mg^{2+}), 正向和反向引物各 1 μl , 0.2 μl Ex *Taq* DNA 聚合酶, 1 μl 待测核酸。目的片段扩增中的 PCR 条件以及引物序列见表 2 (Marks *et al.*, 2005; Dieu *et al.*, 2010; Tang *et al.*, 2013)。

1.5 目的片段克隆及序列比对分析

扩增后的 PCR 产物经 $1\times\text{TBE}$ 电泳缓冲液配制的 1% 琼脂糖凝胶电泳, 将目的条带切下, 用胶回收试剂盒获得目的 DNA, 经 NanoDrop 2000 测定浓度后,

通过 pMD[®]18-T Vector 进行连接转化, 将显示阳性、条带单一的菌液进行测序。测得的序列与 NCBI 数据库进行比对, 其中, 将 ORF14/15 与 TH-96-II 株比对, ORF23/24 与中国台湾株(TW)比对。

2 结果与分析

2.1 PCR 检测结果

对于提取的 WSSV 核酸, 通过在套式 PCR 中的检测, 6 份核酸样品在第一轮中呈阳性, 42 份核酸样品在第二轮中呈阳性。

2.2 ORF14/15 扩增结果

通过对 WSSV 样本的扩增, 共有 21 份(2#、3#、4#、5#、6#、7#、13#、23#、24#、27#、30#、31#、32#、33#、37#、40#、42#、44#、45#、46#和 47#) 样本出现了 ORF14/15 的检测条带, 其能够成功扩增样品的比例为 43.75%。其中, 13#、23#和 24#条带明显比较大, 并且在 3#、44#和 47#一个泳道内均出现了两条大小不一的条带, 这可能是由样品中 DNA 的断裂或片段不完整造成。来源于浙江宁波和湖州、山东即墨、日照和青岛、江苏如东、福建漳浦和广东湛江地区的样品未检出条带(图 1)。

2.3 ORF23/24 扩增结果

在 ORF23/24 扩增中, 有 16 份(2#、3#、5#、6#、7#、23#、24#、27#、38#、39#、40#、41#、42#、44#和 48#) 样本可以扩增出条带, 能够成功扩增样品的比例为 33.33%, 所有样本扩增中的条带大小基本没有差异。浙江湖州和宁波、山东日照、即墨和青岛、江苏如东和赣榆、福建漳浦未有 ORF23/24 扩出(图 2)。

2.4 序列比对

在所有样本的 ORF14/15 扩增中, 共有 4 种大小不一的片段扩增出来, 即 1260 bp (河北曹妃甸)、1270 bp (浙江温州、广州江门、河北黄骅)、1892 bp (河北曹妃甸、江苏南京)和 2662 bp (江苏赣榆、辽宁、福建厦门), 同推测有最长序列的 TH-96-II 比对, 分别缺失 6540 bp、6530 bp、5908 bp 和 5138 bp (图 4)。而在 ORF23/24 扩增中, 片段大小只有微小差异, 分别为 1140 bp (河北曹妃甸、黄骅)和 1146 bp (辽宁、福建厦门、江苏南京、广州湛江和江门、浙江温州)不等, 两种序列中间对应位置相差 6 个碱基, 即 GATATC (图 3)。同中国台湾株进行对比, 缺失的片段大小分别为 12070 bp 和 12064 bp (图 5)。

表1 样本采集信息
Tab.1 Information of sampling

序号 Number	样品编号 Sample Number	产地 Site	品种 Species
1	JC140104001	河北曹妃甸 Caofeidian Hebei	凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>
2	JC140104002	河北曹妃甸 Caofeidian Hebei	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>
3	JC140104003	河北曹妃甸 Caofeidian Hebei	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>
4	JC140104004	河北曹妃甸 Caofeidian Hebei	日本囊对虾 <i>Penaeus japonicus</i>
5	JC140104005	河北曹妃甸 Caofeidian Hebei	日本囊对虾 <i>P. japonicus</i>
6	JC140104006	河北曹妃甸 Caofeidian Hebei	日本囊对虾 <i>P. japonicus</i>
7	JC140104007	河北曹妃甸 Caofeidian Hebei	日本囊对虾 <i>P. japonicus</i>
8	JC140409002	浙江宁波 Ningbo Zhejiang	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>
9	JC140416001	山东即墨 Jimo Shandong	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>
10	JC140418001	山东日照 Rizhao Shandong	日本囊对虾 <i>P. japonicus</i>
11	JC140418010	江苏如东 Rudong Jiangsu	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>
12	JC140418013	江苏赣榆 Ganyu Jiangsu	中国明对虾 <i>Fenneropenaeus chinensis</i>
13	JC140418014	江苏赣榆 Ganyu Jiangsu	脊尾白虾 <i>Palaemon carinicauda</i>
14	JC140418015	江苏如东 Rudong Jiangsu	梭子蟹 <i>Portunidae</i>
15	JC140419001	浙江湖州 Huzhou Zhejiang	罗氏沼虾 <i>Macrobrachium rosenbergii</i>
16	JC140419002	浙江湖州 Huzhou Zhejiang	罗氏沼虾 <i>M. rosenbergii</i>
17	JC140419003	浙江湖州 Huzhou Zhejiang	罗氏沼虾 <i>M. rosenbergii</i>
18	JC140419004	浙江湖州 Huzhou Zhejiang	罗氏沼虾 <i>M. rosenbergii</i>
19	JC140419005	浙江湖州 Huzhou Zhejiang	罗氏沼虾 <i>M. rosenbergii</i>
20	JC140419009	浙江湖州 Huzhou Zhejiang	罗氏沼虾 <i>M. rosenbergii</i>
21	JC140419010	浙江湖州 Huzhou Zhejiang	罗氏沼虾 <i>M. rosenbergii</i>
22	JC140422002	辽宁 Liaoning	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>
23	JC140422003	辽宁 Liaoning	中国明对虾 <i>L. vannamei</i>
24	JC140428002	福建厦门 Xiamen Fujian	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>
25	JC140428003	福建漳浦 Zhangpu Fujian	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>
26	JC140508001	山东青岛 Qingdao Shandong	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>
27	JC140522002	江苏南京 Nanjing Jiangsu	克氏原螯虾 <i>Procambarus clarkii</i>
28	JC140522003	江苏南京 Nanjing Jiangsu	克氏原螯虾 <i>P. clarkii</i>
29	JC140522004	浙江温州 Wenzhou Zhejiang	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>
30	JC140522005	浙江温州 Wenzhou Zhejiang	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>
31	JC140522006	浙江温州 Wenzhou Zhejiang	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>
32	JC140522007	浙江温州 Wenzhou Zhejiang	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>
33	JC140522008	浙江温州 Wenzhou Zhejiang	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>
34	JC140522009	浙江温州 Wenzhou Zhejiang	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>
35	JC140522010	浙江温州 Wenzhou Zhejiang	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>
36	JC140522011	浙江温州 Wenzhou Zhejiang	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>
37	JC140522012	浙江温州 Wenzhou Zhejiang	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>
38	JC140522014	浙江温州 Wenzhou Zhejiang	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>
39	JC140522015	浙江温州 Wenzhou Zhejiang	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>
40	JC140522016	浙江温州 Wenzhou Zhejiang	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>
41	JC140625002	广东湛江 Zhanjiang Guangdong	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>
42	JC140625008	广东江门 Jiangmen Guangdong	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>
43	JC140716007	山东青岛 Shandong Qingdao	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>
44	JC140801003	河北黄骅 Huanghua Hebei	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>
45	JC140801004	河北黄骅 Huanghua Hebei	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>
46	JC140801005	河北黄骅 Huanghua Hebei	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>
47	JC140801006	河北黄骅 Huanghua Hebei	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>
48	JC140801007	河北黄骅 Huanghua Hebei	中国明对虾 <i>F. chinensis</i>

表 2 PCR 引物与反应条件
Tab.2 PCR primers and cycling conditions

引物 Primer	序列 Sequence	预变性 Initial denaturation	变性 Denaturation	延伸 Extension
ORF-14/15F	AATATGGAACGACGGGTG	94℃ 5min	35 个循环: 94℃ 30 s,	72℃ 7 min
ORF-14/15R	GACCAGCGCCTCTTCAG		55℃ 30 s, 72℃ 2 min	
ORF-23/24F	GTAGTGCATGTTTCTCTAAC	94℃ 5min	35 个循环: 94℃ 30 s,	72℃ 7 min
ORF-23/24R	GTAAGTTTATTGCTGAGAAG		51℃ 30 s, 72℃ 1.5 min	

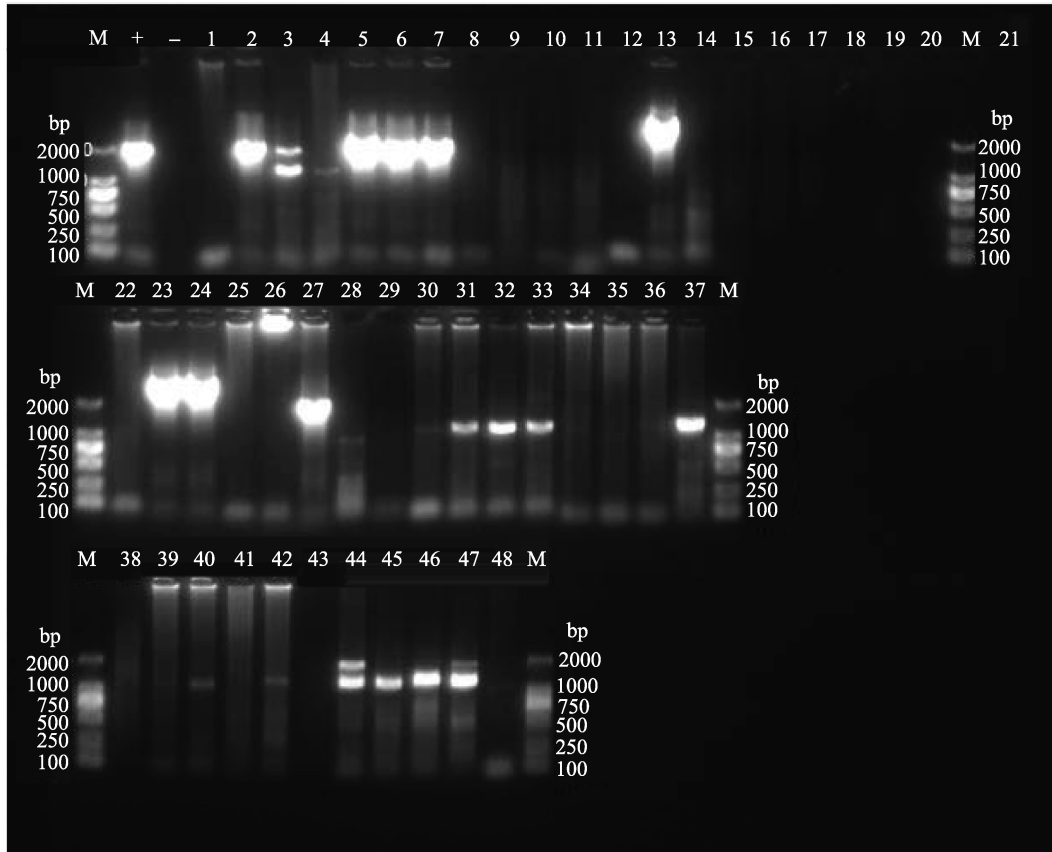


图 1 ORF14/15 扩增
Fig.1 ORF14/15 amplification

M: DNA Marker DL2000; +: 阳性对照; -: 阴性对照; 1-48: 样本编号
M: DNA Marker DL2000; +: positive control; -: negative control; 1-48: number of samples

3 讨论

比较 ORF14/15 和 ORF23/24 扩增结果, 可以看出, 在河北曹妃甸和黄骅、浙江温州、江苏南京、辽宁的部分样本和广东江门、福建厦门地区样本中, ORF14/15 和 ORF23/24 片段均有扩增, 江苏赣榆地区样本中只有 ORF14/15 的扩增片段。除此之外的浙江宁波和湖州、山东即墨、日照和青岛、江苏如东和福建漳浦地区的所有样本两次扩增均未有相应条带出现, 其一致性较高。

已报道亚洲 4 种毒株, 即中国台湾株、中国珠、

泰国株、韩国株的 ORF14/15 片段分别缺失 5138 bp、5132 bp、5316 bp 和 5721 bp。由于 TH-96-Ⅱ株 (AY753327) ORF14/15 片段最为完整, 所以通常将 ORF14/15 与 TH-96-Ⅱ株进行比对。在 ORF14/15 扩增中, 可扩增出的片段序列均含有前 732 个碱基, 说明这一段 732 bp 的序列有较高的保守性, 出现缺失差异的位置主要位于全长片段后段部分。河北黄骅、曹妃甸、浙江温州和广东江门地区的毒株出现较大片段的缺失, 最大缺失 6540 bp。在江苏赣榆、辽宁和福建厦门地区出现的部分缺失为 5138 bp 的毒株与中国台湾株缺失情况一致。在 Tang 等(2013)针对马达加

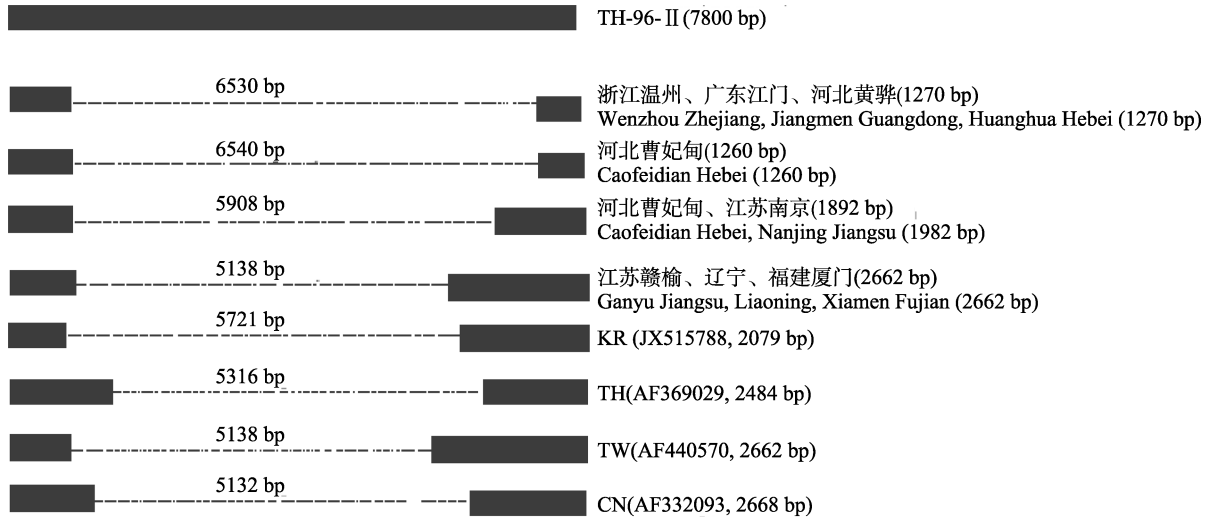


图 4 WSSV 不同毒株 ORF14/15 区域的序列比对

Fig.4 Comparison of missing regions of ORF14/15 of different WSSV strains

左右两边的矩形表示用引物扩增出的序列，中间的虚线表示与 TW- II 相比缺失的部分

Rectangles denoted amplified sequences. Dash lines denoted missing sequences compared to TH-96- II strain

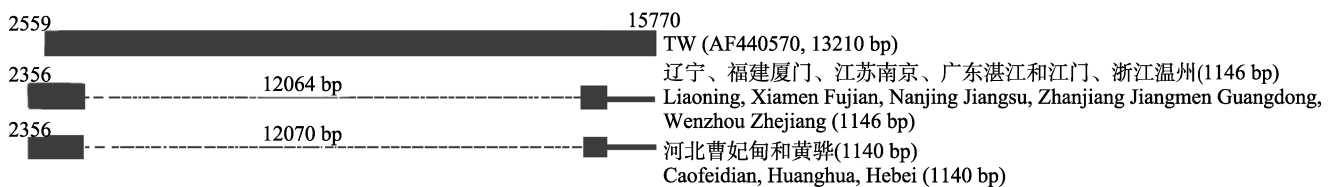


图 5 WSSV 不同毒株 ORF23/24 区域的序列比对

Fig.5 Comparison of missing regions of ORF23/24 of different WSSV strains

右边粗实线表示引物扩增之外的序列，左右两边的矩形表示用引物扩增出的序列，中间的细虚线表示与中国台湾株(TW, AF440570)相比缺失的部分，矩形两边的数字表示与 TW 对应的碱基位置

The right bold lines denoted the region outside the amplified fragments. The right and left rectangles denoted amplified sequences. Dash lines denoted missing sequences compared to the TW strain (AF440570). Numbers on top of the blocks showed the starting and ending positions corresponding to the TW strain (AF440570)

和最小(约 293 kb)的分离株为实验样本,用 RFLP 方法呈现出二者之间的差异,同时两分离株之间的毒性差异也已被观测到,即较小的分离株具有更强的毒性,Zwart 等(2010)也证明如此情况。本研究发现,WSSV 毒株在可变区 ORF14/15 和 ORF23/24 的进化表现出更大程度的缺失,ORF14/15 和 ORF23/24 的缺失没有必然联系,推测两区域的缺失进化是为使病毒基因组更加稳定,从而更好地适应外部环境。有关 ORF14/15 和 ORF23/24 变异与缺失的研究,对追溯 WSSV 毒株世系和发展起到一定帮助,同时为确定“基因组缺失导致更高毒性”是否正确提供了一定的材料依据。

参 考 文 献

童桂香,黎小正,韦信贤,等. 白斑综合征病毒广西株缺失区基因的比较分析. 上海海洋大学学报, 2004, 23(1): 8-13
薛晖,王晓丰,丁正峰,等. 白斑综合征病毒江苏分离株变异

区和缺失区基因的序列比较. 中国水产科学, 2011, 18(5): 1196-1201
Anonymous. SEMBV—an emerging viral threat to cultured shrimp in Asia. CP Shrimp New 3, 1995, 2-3
Cai SL, Huang J, Wang CM, *et al.* Epidemiological studies on the explosive epidemic disease of prawn in 1993-1994. J China Fish, 1995, 19(2): 112-117
Chou HY, Huang CY, Wang CH, *et al.* Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. Dis Aquat Org, 1995, 23(3): 165-173
Dieu BTM, Marks H, Zwart MP, *et al.* Evaluation of white spot syndrome virus variable DNA loci as molecular markers of virus spread at intermediate spatiotemporal scales. J Gen Virol, 2010, 91(5): 1164-1172
Flegel TW. Major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. World J Microbiol Biotechnol, 1997, 13(4): 433-442
Hoa TTT, Zwart MP, Phuong NT, *et al.* Indel-II region deletion sizes in the white spot syndrome virus genome correlate with shrimp disease outbreaks in southern Vietnam. Dis Aquat Org, 2012, 99(2): 153-162
Inouye K, Miwa S, Oseko N, *et al.* Mass mortalities of cultured Kuruma shrimp, *Penaeus japonicus* in Japan in 1993,

- electron-microscope evidence of the causative virus. *Fish Pathol*, 1994, 29(2): 149–158
- Kasornchandra J, Boonyaratpalin S, Itami T. Detection of white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Asia, microscopic observation and polymerase chain reaction. *Aquaculture*, 1998, 164(1–4): 243–251
- Lightner DV. A handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of penaeid shrimp. Special publication of the World Aquaculture Society, LA, Baton Rouge, 1996
- Magbanua FO, Natividad KT, Migo VP, *et al.* White spot syndrome virus (WSSV) in cultured *Penaeus monodon* in the Philippines. *Dis Aquat Org*, 2000, 42(1): 77–82
- Marks H, Goldbach RW, Vlaskovic JM, *et al.* Genetic variation among isolates of white spot syndrome virus. *Arch Virol*, 2004, 149(4): 674–697
- Marks H, van Duijse JJA, Zuidema D, *et al.* Fitness and virulence of an ancestral white spot syndrome virus isolate from shrimp. *Virus Res*, 2005, 110(1): 9–20
- Mohan CV, Shankar KM, Kulkarni S, *et al.* Histopathology of cultured shrimp showing gross signs of yellow head syndrome and white spot syndrome during 1994 Indian epizootics. *Dis Aquat Org*, 1998, 34(1): 9–12
- Nadal ECB, Loh PC. A comparative study of three different isolates of white spot virus. *Dis Aquat Org*, 1998, 33(3): 231–234
- Park JH, Lee YS, Lee S, *et al.* An infectious viral disease of penaeid shrimp newly found in Korea. *Dis Aquat Org*, 1998, 34(1): 71–75
- Pradeep B, Shekar M Karunasagar I, *et al.* Characterization of variable genomic regions of Indian white spot syndrome virus. *Virology*, 2008, 376(1): 24–30
- Tang KJF, Marc LG, Lightner DV. Novel, closely related, white spot syndrome virus (WSSV) genotypes from Madagascar, Mozambique and the Kingdom of Saudi Arabia. *Dis Aquat Org*, 2013, 106(1): 1–6
- Vlaskovic JM, Bonami JR, Flegel TW, *et al.* *Nimaviridae*. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA (Eds.), *Virus Taxonomy*. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier, Amsterdam, 2005, 187–192
- Wongteerasupaya C, Vickers JE, Sriurairatana S, *et al.* A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Dis Aquat Org*, 1995, 21(2): 69–77
- Zwart MP, Dieu BTM, Hemerik L, *et al.* Evolutionary trajectory of white spot syndrome virus (WSSV) genome shrinkage during spread in Asia. *PLoS One*, 2010, 5(10): e13400

(编辑 冯小花)

Comparison of the Missing Sequences of ORF14/15 and ORF23/24 of WSSV from Different Regions of China in 2014

SUN Xinying^{1,3}, LIU Qinghui^{1,2}①, WAN Xiaoyuan^{1,2}, HUANG Jie^{1,2}

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071; 3. Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

Abstract White spot syndrome virus (WSSV) is one of the major pathogens that severely harm shrimp aquaculture. Different strains of WSSV display various virulence. In order to understand the geographic variation in fragments ORF14/15 and ORF23/24 of WSSV in China, we collected 48 samples of WSSV-infected shrimp from disease outbreak areas in 7 provinces of China between January and August in 2014. We identified the genotypes of WSSV-positive samples using PCR with ORF14/15 and ORF23/24 specific primers, and the amplified fragments were conjugated into T-vectors and transformed into the Top10 cells. We selected the positive clones and obtained their sequences. Then we compared the missing fragments of ORF14/15 and ORF23/24 from different samples with the sequences of TH-96-II and China Taiwan strain (TW, AF440570) respectively. There were 21 samples with the products of ORF14/15 amplification, and 16 samples with the products of ORF23/24 amplification. The amplification ratios of ORF14/15 and ORF23/24 were 43.75% and 33.33% respectively. There were only 4 types of ORF14/15 compared to TH-96-II. The lengths of the amplified fragments were 1260 bp, 1270 bp, 1892 bp and 2662 bp, corresponding to the missing 6540 bp, 6530 bp, 5908 bp and 5138 bp respectively compared to TH-96-II. There were two types of ORF23/24 compared to the TW strain. The lengths of the amplified fragments were 1140 bp and 1146 bp, corresponding to the missing 12070 bp and 12064 bp respectively compared to the TW strain. These results suggested a certain degree of prevalence and variation of WSSV in China. There was an obvious difference in ORF14/15 between different strains, but only a minimal difference in ORF23/24. It is most likely that the variation in the missing fragments correlates with divergent WSSV virulence in different regions, and this notion needs to be further tested.

Key words WSSV; ORF14/15; ORF23/24; Sequence analysis

① Corresponding author: LIU Qinghui, E-mail: liuqh@ysfri.ac.cn