

**DETEKSI DISTRIBUSI WHITE SPOT SYNDROME VIRUS PADA BERBAGAI ORGAN UDANG VANAME (*Litopenaeus vannamei*)****Detection of Virus White Spot Syndrom Distribution on Several Organ of Vaname Shrim (*Litopenaeus vannamei*)**

A. Aliah Hidayani\*, Asmi C. Malina, Bunga R. Tampangallo,  
dan Achmad F. Fathurrahman

Diterima: 27 Februari 2015; Disetujui: 27 Maret 2015

**ABSTRACT**

*One way to detect the presence of the White Spot Syndrome Virus in several organs Vaname shrimp (*Litopenaeus vannamei*) were infected with the method of Polymerase Chain Reaction (PCR). WSSV virus is known to attack various target organs, but it is difficult to detect early on shrimp. Therefore, this study aims to detect the presence of the distribution of White Spot Syndrome Virus in several organs Vaname shrimp (*Litopenaeus vannamei*) were infected with the Polymerase Chain Reaction method in order to early detection efforts for the prevention and treatment of diseases caused by the virus. Organ observed that the swimming legs, gills, stomach and antennal gland. Research stages include sample preparation and DNA extraction, DNA amplification and electrophoresis. DNA extraction was performed using the method DTAB and CTAB-DNA amplification is done by using nested PCR. The emergence of DNA bands is an indicator of the presence of WSSV in shrimp Vaname several organs which are then presented deskriptif. The results showed four WSSV infected organs were observed. Based on the appearance, the entire sample of the swimming leg and antennal gland positively infected, then successively gills and stomach. The swimming leg can be used to diagnose the disease early on shrimp WSSV Vaname without turning off the shrimp.*

*Keywords : Distribution, Vanname shrimp, WSSV, PCR*

**PENDAHULUAN**

Tahun 2003, industri udang memasuki masa kelam. Udang windu terserang penyakit yang mematikan. Sekitar 60 persen dari 410.000 tambak tradisional hancur akibat impor udang yang membawa patogen dan tidak terdeteksi. Berbagai kasus kematian dalam budidaya udang windu, baik akibat lingkungan perairan yang kurang mendukung maupun adanya serangan penyakit bakteri dan virus. Sedikitnya 20 jenis virus penyebab penyakit pada budidaya udang telah dilaporkan (Zhang *dkk.* 2004 dalam Parenrengi, 2010). Dampak serangan virus tersebut menyebabkan petambak udang membudidayakan jenis udang baru yaitu udang vaname (*Litopenaeus vannamei*). Peralihan komoditas ini didukung oleh SK Menteri Kelautan dan Perikanan No. 41/2001 tanggal 12 Juli 2001 yang secara resmi melepas udang vaname sebagai varietas unggul (Sukenda *et al.*, 2009).

Kehadiran udang Vaname di Indonesia pada awalnya dapat diterima dan berkembang dengan baik oleh pembudidaya udang. Namun, produksi udang kembali mengalami kemerosotan beberapa tahun terakhir seiring kemunculan penyakit. Virus disinyalir menjadi patogen paling berperan memicu penyakit pada udang. Setiap fase hidup dari udang Vaname rentan diserang oleh infeksi virus yang mengakibatkan perubahan bentuk tubuh, ukuran benih yang tidak seragam, pertumbuhan yang lambat, hingga mortalitas (Balai Budidaya Laut Lampung, 2011). WSSV (*White Spot Syndrome Virus*) merupakan salah satu penyakit yang menjadi penyebab utama penurunan produksi udang vaname.

Pada kasus WSSV, adanya bintik atau spot putih pada bagian karapas sudah menjadi tanda umum (Wang *dkk.*, 1997), tetapi pada induk udang warnanya menjadi merah (Mahardika *dkk.*, 2004).

---

**\* Korespondensi:**

Program Studi Budidaya Perairan, Jurusan Perikanan, FIKP, Universitas Hasanuddin  
Jl. Perintis Kemerdekaan Km 10, Tamalanrea, Makassar 90245  
Telp./Fax: (0411) 587000, email : Lhia\_achsan@yahoo.com

Udang yang terserang penyakit ini dalam waktu singkat udang dapat mengalami kematian (Anonim, 2004). Sudha *dkk.* (1998) menyebutkan bahwa bila udang yang terserang WSSV tetapi belum terdapat tanda bintik putih, dikategorikan pada tipe III (kronis) dimana infeksi yang dialami oleh jaringan rendah sehingga bintik putih dan kemerahan pada udang tidak tampak. Kemudian disebutkan pula bahwa kematian akan terjadi lebih lama yaitu 15-28 hari. Organ-organ target yang diserang yang dapat dijadikan sebagai indikator serangan yaitu sel-sel insang, hepatopankreas dan usus. Sel-sel hepatopankreas, usus dan insang yang terserang penyakit WSSV mengalami kerusakan yang ditandai dengan hipertopi inti (*eosinofilik hipertropi*) dan *inclusion bodies sel*.

Dalam penanganan WSSV pada udang Vaname, deteksi awal pada beberapa organ dengan metode PCR memungkinkan untuk dilakukan. Namun, belum ada penelitian yang khusus menginvestigasi secara langsung keberadaan WSSV pada beberapa organ udang Vaname secara alami. Oleh karena itu penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi distribusi keberadaan *White Spot Syndrome Virus* pada beberapa organ tubuh udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*) yang terinfeksi dengan metode *Polymerase Chain Reaction* dalam rangka upaya deteksi awal untuk pencegahan dan penanganan terhadap penyakit yang disebabkan oleh virus tersebut.

## METODE PENELITIAN

### Prepasi Sampel

Organ organisme uji adalah udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*) yang dipelihara di tambak, dengan bobot rata-rata 11,49 g sebanyak delapan ekor yang menunjukkan gejala telah terinfeksi WSSV maupun kontrol negatif dikoleksi terlebih dahulu. Organ yang akan digunakan yaitu *antennal gland*, lambung, insang, dan kaki renang (*pleiopod*). Pengambilan kaki renang dan insang dilakukan dengan memotong organ tersebut secara langsung. Pengambilan lambung dilakukan dengan cara memotong udang secara vertikal pada bagian abdomen, kemudian membuka daging yang terdapat pada sekitar lambung hingga organ tersebut mudah dipisahkan. Pengambilan *antennal gland* dilakukan dengan cara memotong mengikuti posisi pangkal antena hingga bagian pangkal, kemudian membelah bagian kepala berdasarkan *antennal gland* hingga organ tersebut nampak dan mudah dipisahkan. Pemisahan organ yang digunakan dilakukan secara aseptik dan dimasukkan ke dalam botol yang telah diisi larutan etanol 70%.

### Ekstraksi DNA Udang Vaname

Ekstraksi genom DNA udang vanname diisolasi mengacu pada metode DTAB – CTAB *solution* (IQ2000<sup>TM</sup>, 2009) dengan prosedur sebagai berikut :

1. Sampel yang telah disiapkan ditimbang sekitar 0,03 g dan dimasukkan ke dalam mikrotube 1,5 ml.
2. Sampel yang ditambahkan 600 µl DTAB *solution*, kemudian dihancurkan dengan *pestle* hingga homogen, divortex hingga homogen.
3. Sampel diinkubasi pada *water bath* bersuhu 75°C selama 5 menit kemudian divortex hingga homogen.
4. Sampel ditambahkan 700 µl kloroform, vortex selama 20 detik dan disentrifuse pada kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit.
5. Selanjutnya supernatant dipindahkan ke *tube* baru ukuran 200 µl, setelah itu ditambahkan 100 µl larutan CTAB *solution* dan 900 µl ddH<sub>2</sub>O, vortex sebentar, kemudian inkubasi dalam *water bath* bersuhu 75°C selama 5 menit.
6. Sampel didinginkan pada suhu ruang dan disentrifuse pada kecepatan 12000 rpm selama 10 menit.
7. Supernatant kemudian dipindahkan dengan hati-hati, campurkan pellet dengan 150 µl larutan *Dissolve solution*, inkubasi pada suhu 75°C selama 5 menit kemudian dinginkan pada suhu ruang.
8. Sampel kemudian disentrifuse pada kecepatan 12000 rpm selama 5 menit. Lalu lapisan bening dipindahkan ke *tube* baru berukuran 0,5 µl dengan 300 µl etanol 75%
9. Vortex hingga homogen, sampel kemudian disentrifuse pada kecepatan 12000 rpm selama 5 menit, kemudian pellet dicuci dengan menambahkan 200 µl etanol 95%, homogenkan,

keringkan pellet selama kurang lebih 2 – 3 jam atau sampai dikira betul-betul kering dan terakhir tambahkan TE buffer sebanyak 200 µl.

10. Sampel di simpan dalam lemari pendingin bersuhu -20°C.

#### 1. Amplifikasi *first* PCR

Denaturasi : 94°C 30 detik; 62°C 30 detik; 72°C 30 detik, selama 5 siklus, kemudian annealing : 94°C 15 detik; 62°C 15 detik; 72°C 20 detik selama 15 siklus, selanjutnya extension: 72°C 30 detik; 20°C 30 detik; dan extansion akhir pada suhu 4°C.

#### 2. Amplifikasi Nested PCR

94°C 20 detik; 62°C 30 detik; 72°C 30 detik selama 25 siklus, tambahkan 72°C 30 detik; 20°C 30 detik diakhir siklus.

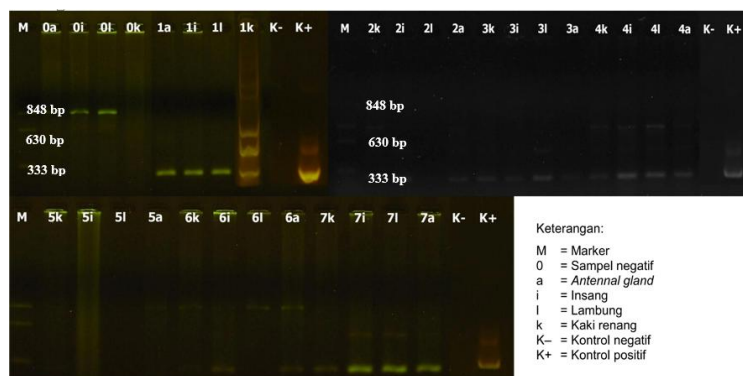
Setelah proses PCR dilakukan proses elektroforesis agarosa 2% dengan komposisi sampel sebanyak 7 µl dan loading dye sebanyak 3 µl. elektroforesis ini menggunakan marker 100bp sebanyak 1 µl dan kontrol positif dan kontrol negatif. Hasil elektroforesis diamati dibawah UV transilluminator sekaligus pengambilan gambar (IQ2000<sup>TM</sup>, 2009).

### Analisis Data

Kemunculan pita DNA merupakan indikator keberadaan WSSV pada beberapa organ udang Vaname yang kemudian disajikan secara deskriptif. Berdasarkan IQ2000<sup>TM</sup> (2009) Kemunculan pita pada 333 bp menandakan infeksi ringan (I), pada 333 bp dan 630 bp menandakan infeksi sedang (II), pada 333 bp, 630 bp, dan 848 bp menandakan infeksi berat (III), hanya pada 848 bp (*housekeeping gene*, menunjukkan genom berhasil diekstraksi atau *internal control*) atau tidak adanya pita yang muncul menandakan negatif WSSV.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil elektroforesis PCR WSSV, terlihat bahwa hasil visualisasi DNA dari 8 ekor udang vanname positif terinfeksi WSSV. Hal ini dapat dilihat dengan munculnya pita DNA yang memiliki 3 garis ditiap masng-masing marker (848 bp, 630 bp dan 333 bp). Berdasarkan buku panduan IQ2000 WSSV detecton and prevention system, apabila pita DNA berada pada posisi fragmen 848 bp, 630 bp dan 333 bp menunjukkan bahwa udang tersebut terinfeksi WSSV dengan tingkat *very light* dan *severe* (parah) yang artinya udang terinfeksi positif 3. Jika udang terinfeksi positif 3 kemungkinan tingkat infeksi virus WSSV adalah 2000 copy DNA. Pembacaan hasil visualisasi hasil elektroforesis sesuai buku panduan memiliki tingkat penginfeksi yang terdiri dari *light*, *very light*, *medium* dan *severe* (Sanjuktha *et al.*, 2012). Posisi fragmen 296 bp dan 550 bp menunjukkan terinfeksi WSSV (*medium* dan *light*). Pemunculan pita pada setiap marker (848 bp, 630 bp dan 333 bp) menandakan positif terinfeksi WSSV pada tahap *very light* dan *severe* (parah). Apabila posisi pita hanya muncul 848 bp, hal ini menandakan tidak terinfeksi WSSV. Hal itu diyakini bahwa 848 bp merupakan gen murni dari udang bukan dari virus WSSV. Namun apabila tidak terlihat pita sama sekali didalam gel elektroforesis itu menandakan kualitas DNA kurang baik. Hasil elektroforesis tersebut dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Visualisasi hasil PCR deteksi gen WSSV pada beberapa organ

Deteksi Distribusi White Spot Syndrome Virus pada Berbagai Organ Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*)

Berdasarkan hasil visualisasi (Gambar 1), distribusi gen WSSV pada beberapa organ udang Vaname dapat dilihat pada tabel berikut.

Tabel 1. Distribusi WSSV pada beberapa organ udang Vaname

| Nomor Sampel | Organ Tubuh Udang |        |                |                  |
|--------------|-------------------|--------|----------------|------------------|
|              | Kaki renang       | Insang | Epitel lambung | Kelenjar antenal |
| 0            | -                 | -      | -              | -                |
| 1            | +3                | +3     | +2             | +3               |
| 2            | +2                | +2     | -              | +3               |
| 3            | +3                | +1     | +2             | +1               |
| 4            | +3                | +3     | +3             | +3               |
| 5            | +1                | -      | -              | +1               |
| 6            | +1                | +1     | -              | +1               |
| 7            | +1                | +2     | +2             | +2               |

Keterangan: 0 = sampel kontrol negatif; - = tidak terinfeksi; +1 = infeksi ringan (I); +2 = infeksi sedang (II); +3 = infeksi berat (III)

Tabel di atas menunjukkan bahwa keempat organ sampel yang diamati terdeteksi positif terinfeksi WSSV. Sedangkan pada sampel kontrol negatif menunjukkan hasil deteksi yang negatif dengan tidak adanya pita yang muncul. Berdasarkan kemunculan pita gen WSSV, seluruh sampel kaki renang dan *antennal gland* terdeteksi positif WSSV. Pada organ insang terdapat enam dari tujuh sampel yang terdeteksi positif WSSV. Namun, pada lambung hanya terdapat empat dari tujuh sampel yang diperiksa terdeteksi positif WSSV.

Berdasarkan hasil penelitian di atas menunjukkan bahwa sel-sel organ yang berbeda memberikan respon yang berbeda juga terhadap virus yang sama. Perbedaan tersebut diduga terkait dengan struktur perbedaan antara struktur jaringan kaki renang, *antennal gland*, insang dan lambung. Kaki renang menjadi salah satu organ target yang mudah terinfeksi WSSV. Hal ini diduga karena kaki renang merupakan salah satu organ yang tersusun dari sel epitel subkutikular, salah satu jaringan target WSSV, yang diperkuat oleh beberapa penelitian yang telah dilakukan oleh Nash dan Akarajamorn (1995) dan Chang *dkk.* (1996) bahwa sel epitel kutikular merupakan salah satu lokasi yang paling disukai WSSV dan dapat menjadi lokasi pertamamasuknya virus. Hasil investigasi Rajendran *dkk.* (2005) pada udang windu memperkuat bahwa kaki renang merupakan organ yang paling mudah terserang WSSV. Selain itu, WSSV yang pada sedimen tanah masih bersifat infeksi (Kumar *dkk.*, 2013) sehingga memungkinkan infeksi WSSV melalui alat gerak, termasuk kaki renang.

*Antennal gland* merupakan salah satu organ vital pada krustasea, termasuk udang Vaname. Organ ini memiliki peran yang sangat penting dalam sistem regulasi tubuh, seperti mengatur keseimbangan air dan kalsium, menjaga volume hemolymph, regulasi ion dan osmotik dan detoksifikasi logam berat (Ahearn *dkk.*, 1999; Wheatly 1999; Lin *dkk.*, 2000). Berdasarkan fungsi tersebut, kelenjar antenal menjadi salah satu organ yang sangat beresiko terserang WSSV. Hal tersebut karena organ ini memiliki peran yang sangat krusial dalam pemeliharaan homeostasis udang (Escobedo-Bonilla *dkk.*, 2007) Apalagi organ tersebut fungsi organ ini yang sangat berkaitan dengan paparan terhadap hemolymph yang tinggi. Tampangallo *dkk.* (2009) menemukan bahwa hemolymph memiliki prevalensi WSSV tertinggi. Berdasarkan hal tersebut, hemolymph dapat menjadi pembawa WSSV menuju kelenjar antenal hingga pada akhirnya mereplikasi diri pada organ ini.

Selain itu juga terkait dengan kondisi pertahanan tubuh udang itu sendiri. Berdasarkan penelitian Peng *dkk.* (1998) dalam Mufidah dan Koesharyani (2010) menyatakan bahwa infeksi WSSV sangat patogenik pada kondisi udang yang diberikan tekanan, hal ini karena mekanisme pertahanan tubuh udang tidak dapat mencegah atau menahan perbanyakan WSSV di bawah kondisi stress. WSSV dapat menyebar dengan cepat ke berbagai organ seperti jantung, epidermis, otot maupun sistem pencernaan meski dalam jumlah yang kecil.

Insang dan lambung merupakan sistem pencernaan dari udang juga termasuk dalam salah satu organ target WSSV. Chou *dkk.* (1995) mengindikasikan bahwa WSSV dapat menginfeksi udang melalui air maupun inokulasi oral. Hasil penelitian Chang *dkk.* (1996) menunjukkan bahwa pasca penginfeksian terdapat beberapa udang yang terdeteksi WSSV pada lambung namun tidak pada insang, begitupun sebaliknya yang mengindikasikan infeksi virus memungkinkan melalui oral maupun air. Chang *dkk.* (1998) menyatakan bahwa WSSV berpotensi ditransmisikan melalui proses kanibalisme udang yang baru mati. Namun, dari data yang didapatkan, infeksi pada insang lebih banyak ditemukan daripada lambung. Hal tersebut mengindikasikan bahwa pada kasus ini udang sampel yang didapatkan lebih besar kemungkinan terinfeksi melalui air media yang terkontaminasi WSSV daripada melalui oral seperti pemangsa atau kanibalisme.

Upaya memonitoring WSSV pada tambak yang sementara eksis disarankan menjadi salah satu metode pengawasan kesehatan pada tambak udang (Peng *dkk.*, 2001). Berdasarkan hasil yang didapatkan, kaki renang merupakan organ yang paling potensial untuk mendiagnosa secara dini WSSV pada udang Vaname tanpa mematakannya. Rajendran *dkk.* (2005) menyarankan hal yang sama pada udang windu.

### KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa keempat organ yang diamati positif terinfeksi WSSV. Berdasarkan kemunculannya, seluruh kaki renang dan *antennal gland* terinfeksi WSSV, disusul secara berturut-turut adalah insang dan lambung.

### Daftar Pustaka

- Ahearn G.A., J.M. Duerr, G.Z. Zhuang, R.J. Brown, A. Aslamkham, D.A. Killebrew. 1999. Ion transport processes of crustacean epithelial cells. *Physiol. Biochem. Zool.*, 72 (1) : 1–18.
- Anonim. 2004. Penyakit Utama Penyebab Kematian Udang di Tambak dan Cara Penanggulangannya. Direktorat Kesehatan Ikan dan Lingkungan, Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya Departemen Kelautan dan Perikanan. Jakarta.
- Balai Budidaya Laut Lampung. 2011. Pengelolaan Kesehatan Ikan Budidaya Laut. Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya, Departemen Kelautan dan Perikanan, Jakarta.
- Chang P. S., C. F. Lo, Y .C. Wang. dan G. H. Kou .1996. Identification of white spot syndrome associated baculovirus (WSBV) target organs in the shrimp *Penaeus monodon* by *in situ* hybridization. *Dis. Aquat. Organ.* 27: 131–139.
- Chang, P.S., H.C. Chen dan Y.C. Wang. 1998. Detection of White Spot Syndrome Associated Baculovirus in Experimentally Infected Wild Shrimp, crab and Lobsters by *in situ* Hybridization *Aquacult.* 164: 233–242.
- Chou, H. Y., C. Y. Huang, C. H. Wang, H. C. Chiang dan C. F. Lo. 1995. Pathogenicity of A Baculovirus Infection Causing White Spot Syndrome In Cultured Penaeid Shrimp In Taiwan. *Dis. Aquat. Organ.* 23: 165–173.
- Escobedo-Bonilla, C.M., M. Wille, V. A. Sanz, P. Sorgeloos, M. B. Pensaert dan H. J. Nauwynck. 2007. Pathogenesis of a Thai Strain of White Spot Virus Syndrome (WSSV) in Juvenile, Specific Pathogen-Free *Litopenaeus vannamei*. *Dis. Aquat. Org.* Vol. 74: 85-94.
- IQ2000™. 2009. IQ2000™ WSSV Instruction Manual. GeneResearch Biotechnology Corp. Taiwan. 19 hlm.
- Kumar, S. S., R. A. Bharathi, J.J.S. Rajan, S.V. Alavandi, M. Poornima, C.P. Balasubramanian, dan A.G. Ponniah. 2013. Viability of white spot syndrome virus (WSSV) in sediment during sun-drying (drainable pond) and under non-drainable pond conditions indicated by infectivity to shrimp. *Aquaculture* 402-403: 119-126.
- Lin, S.-C., Liou, C.-H., Cheng, J.-H., 2000. The role of the antennal glands in ion and body volume regulation of cannulated *Penaeus monodon* reared in various salinity conditions. *Comp. Biochem. Physiol.* 127A: 121–129.
- Mahardika K, Zafran dan I. Koesharyani. 2004. Deteksi *White Spot Syndrome Virus* (WSSV) Pada Udang Windu (*Penaeus monodon*) di Bali dan Jawa Timur Menggunakan Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). *Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia*, 10 (1): 55-60.
- Mufidah T dan I. Koesharyani. 2010. Histopatologi kasus multi infeksi alami White Spot Syndrome Virus (WSSV) dan Infectious Hypodermal Haematopoietic Necrosis Virus (IHHNV) pada *Penaeus monodon*. *Prosiding Forum Inovasi Teknologi Akuakultur 2010*. Hlm. 921-926.

- Nash, G. dan A. Akarajamorn. 1995. Sequential histopathology of systemic ectodermal and mesodermal baculovirus infection in *Penaeus monodon* Fabricius. *Asian Shrimp News* 3: 2.
- Rajendran, K. V., K. K. Vijayan, T. C. Santiago dan J. J. S. Rajan. 2005. White spot syndrome virus (WSSV) infection in tiger shrimp *Penaeus monodon*: A non-lethal histopathological rapid diagnostic method using paraffin and frozen sections. *Aquaculture International* Vol. 13: 341–349.
- Parenrengi, A. 2010. Peningkatan Resistensi Udang Windu *Penaeus Monodon* Terhadap Penyakit White Spot Syndrome Virus (WSSV) Melalui Transfer Gen *Penaeus monodon* Antiviral. [Desertasi]. Bogor : Sekolah Pascasarjana, Institute Pertanian Bogor.
- Peng, S.E., C.F. Lo, S.C. Lin, L.L. Chen, Y.S. Chang, K.F. Liu, M.S. Su dan G.H. Kou. 2001. Performance of WSSV infected and WSSV-negative *Penaeus monodon* post larvae in culture ponds. *Diseases of Aquatic Organisms* 46, 165–172.
- Sanjuktha, M., V.S. Raj, K. Aravindan, S.V. Alavandi, M. Poornima and T.C. Santiago. 2012. Comparative Efficacy of Double-Stranded RNAs targeting WSSV Structural and Nonstructural genes in Controlling Viral Multiplication in *Penaeus monodon*. *Arch. Virol* 157 : 993-998.
- Sudha PM, C. V. Mohan, K. M. Shankar and A. Hedge. 1998. Relationship Between White Spot Syndrome Virus Infection and Clinical Manifestation in Indian Cultured Penaeid Shrimp. *Aquaculture*, 167: 95-1001.
- Sukenda, S. H. Dwinanti dan M. Yuhana. 2009. Keberadaan White Spot Syndrome Virus (WSSV), Taura Syndrome Virus (TSV) dan Infectious Hypodermal Haematopoietic Necrosis Virus (IHHNV) Di Tambak Intensif Udang Vaname *Litopenaeus vannamei* Di Bakauheni, Lampung Selatan. *J. Akuakultur Indonesia* Vol 8(2):1-8.
- Tampangallo, B.R., Muliani dan M. Atmomarsono. 2009. Organ Target Serangan Virus *White Spot* Pada Udang Menggunakan *Polymerase Chain Reaction*. Prosiding Forum Inovasi dan Teknologi Akuakultur (FITA), Hotel Majapahit, Surabaya.
- Wang CS, Y. J. Tsai, G. H. Kou and S. N. Chen. 1997. Detection of White Spot Syndrome Disease Virus Infection in Wild Caught Greasyback Shrimp, *Metapenaeus ensis* (deHaan) in Taiwan. *Fish Pathology*, 32 (1): 35-41.
- Wheatly M.G. 1999. Calcium homeostasis in Crustacea: the evolving role of branchial, renal, digestive and hypodermal epithelia. *J. Exp. Zool.*, 283: 620–640.