KUALITAS SEMEN SEGAR KAMBING BOER PADA TEMPERATUR PENYIMPANAN 4 ^{O}C DENGAN MENGGUNAKAN PENGENCER SITRAT DAN SUPLEMENTASI SUSU KEDELAI BUBUK

Winda Rahayu[1], Agung Pramana W.M[1], Gatot Ciptadi[2]
[1]Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
[2]Fakultas Peternakan
Universitas Brawijaya
Email : windarahayu50@yahoo.co.id

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pengencer susu kedelai bubuk berdasarkan konsentrasinya F1(2%), F2 (4%) dan F3 (6%) dalam pengencer sitrat terhadap motilitas, viabilitas, abnormalitas dan integritas membran spermatozoa berdasarkan lama penyimpanan (0 jam, 24 jam, 72 jam, 120 jam). Penelitian ini menggunakan media pengencer berbasis media nabati (lesitin) yaitu Andromed® (K+), susu kedelai dalam pengencer sitrat dengan konsentrasi 0% (K-), 2% (F1), 4% (F2) dan 6% (F3). Pengamatan dilakukan sebelum pengenceran yaitu pengamatan volume, warna, konsistensi, pH, motilitas massa, motilitas individu, viabilitas, konsentrasi, dan abnormalitas. Selanjutnya dilakukan pengenceran berdasarkan perlakuan dengan masing-masing tiga ulangan dan dilakukan penyimpanan pada suhu 4^{o}C, lalu pengamatan pasca penyimpanan yaitu motilitas, viabilitas, abnormalitas, dan integritas membran. Penelitian ini menggunakan RAL faktorial dan dianalisis menggunakan *two way* ANOVA dengan program SPSS versi 16.0 dan dilanjutkan dengan uji Tukey. Hasil penelitian secara umum menunjukkan adanya beda nyata (P<0,05) untuk pengencer K+, F1, dan F2 terhadap pengencer K- dan F3. Adanya kandungan lesitin pada susu kedelai mampu melindungi spermatozoa dari cekaman dingin (*cold shock*) selama penyimpanan pada suhu 4 ^{o}C. Konsentrasi susu kedelai bubuk yang terlalu tinggi kemungkinan menyebabkan perubahan pH pada media dan mempengaruhi tekanan osmotik pada membran spermatozoa sehingga menurunkan kualitas spermatozoa selama penyimpanan.

Kata kunci : Lesitin, membran plasma, susu kedelai

ABSTRACT

The objective of this research was to know the influence of soybean milk powder diluents based on concentration (2%, 4%,6%) in citrate diluent to motility, viability, abnormality and membrane integrity of spermatozoa based on long duration storage (0 hours, 24 hours, 72 hours, 120 hours). This research using diluent medium based on vegetable medium (lechitin) is andromed (K+), soybean milk in diluent citrate with concentrations of 0% (K-), 2% (F1), 4% (F2), and 6% (F3). The characterization of predilution were observed such as volume, color, consistency, pH, mass motility, individual motility, viability, concentration, and abnormality. Next step dilution based on treatment with each of the three recurrence and performed storage at temperature of 4˚C. The next of post storage were observed such as sperm viability, motility, abnormality and membrane integrity. Data were analyzed using two way ANOVA in factorial completely randomized design with SPSS version 16.0 and continued with Tukey test. The results showed that a significant difference (P<0.05) to K+, F1, and F2 diluent to K- and F3 diluent. The presence of lechitin content of soybean milk can protect spermatozoa from cold shock during storage at a temperature of 4˚C. The concentration of soy milk powder high possibility changes to pH of the media and influenced of osmotic presure on sperm membrane decrease of the sperm quality during storage.

Key word: Lechitin, plasma membrane, soybean milk

PENDAHULUAN

Kambing Boer merupakan salah satu jenis kambing yang memiliki potensi pertumbuhan dan bobot hidup yang tinggi, serta memiliki sifat fertilitas yang baiK [3]. Pemuliaan kambing Boer saat ini banyak dilakukan dengan sistem inseminasi buatan (IB) namun program ini belum sepenuhnya berhasil karena terdapat beberapa faktor yang mempengaruhi salah satunya adalah kualitas semen kambing Boer.

Salah satu faktor yang mempengaruhi kualitas semen kambing Boer adalah sistem penyimpanan semen kambing Boer. Penyimpanan semen segar banyak dilakukan pada peternakan kambing yang memiliki keterbatasan alat penyimpanan. Penyimpanan segar dapat dilakukan dengan menggunakan media pengencer yang mendukung sperma supaya tetap hidup tanpa mengurangi kemampuannya untuk fertilisasi. Salah satu

faktor pembatas dalam penyimpanan segar semen adalah kapasitasi spermatozoa.

Berdasarkan hal tersebut diperlukan media yang baik untuk melindungi sperma supaya tetap mampu berkapasitasi pada waktu dan tempat yang tepat. Sumber lesitin nabati banyak ditemukan pada berbagai tanaman salah satunya adalah kacang kedelai. Keunggulan lesitin kacang kedelai memiliki kandungan phospolipid antara lain fosfatidil choline 17,50% dan 23,00%, fosfatidil ethanolamine 15,00% dan 20,00%, glikolipid 13-16%, phospolipid lainnya 14-18% dan trigliserida 2-4% [11].

Berdasakan hal tersebut penelitian ini menggunakan sumber lesitin nabati yang berasal dari kacang kedelai dalam bentuk susu kedelai bubuk sebagai media penyimpanan sementara semen segar sehingga diharapkan sumber lesitin nabati ini dapat mempertahankan viabilitas dan kemampuan spermatozoa dalam berkapasitasi sehingga tetap mampu melakukan fertilisasi secara *in vitro.*

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan pada mulai Bulan Januari-Maret 2014 di Laboratorium Sumber Sekar, Batu dan Laboratorium Fisiologi Hewan, serta Laboratorium Biologi Molekuler, Universitas Brawijaya, Malang pada Bulan Januari-Maret 2014. Materi yang digunakan dalam penelitian ini adalah kambing Boer berumur 4 tahun dan berat badan 75 kg dengan kondisi sehat dan normal, semen kambing Boer. Pengencer yang digunakan sebagai perlakuan yaitu Andromed® (K+) yang diencerkan dengan aquabidest adalah 1:4. Pengencer sitrat dan susu kedelai dibuat dengan susu kedelai bubuk yang dilarutkan sesuai konsentrasi masing-masing 0% (K-), 2% (F1), 4% (F2) dan 6% (F3). Selanjutnya ditambahkan asam sitrat, fruktosa, penicillin, dan streptomycin dan gliserol secara berurutan dan setiap penambahan dilakukan apabila zat sebelumnya sudah terlarut. Larutan dipindahkan ke dalam tabung propilen 15ml dan sentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 2000 rpm untuk pengencer F1, F2 dan F3, lalu diambil supernatannya dan dimasukkan dalam tabung propilen, lalu ditutup dengan alumunium foil dan disimpan dalam lemari es. Selanjutnya pengencer di hangatkan terlebih dahulu pada waterbath suhu 36-38 ^{o}C jika akan digunakan.

Rancangan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola faktorial 5x4. Variabel yang diamati sebelum pengenceran dan penyimpanan yaitu yaitu pengamatan volume, warna, konsistensi, pH, motilitas massa, motilitas individu, viabilitas, konsentrasi, dan abnormalitas. Selanjutnya dilakukan pengenceran berdasarkan perlakuan dengan masing-masing tiga ulangan dan dilakukan penyimpanan pada suhu 4^{o}C, lalu pengamatan pasca penyimpanan yaitu motilitas, viabilitas, abnormalitas, dan integritas membran. Selanjutnya data dianalisis dengan uji ANOVA menggunakan dan SPSS versi 16.0 dan dilanjutkan dengan uji *Tukey*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Evaluasi makroskopis terhadap kualitas semen kambing Boer antara lain volume, warna, bau, konsistensi, dan pH. Selanjutnya evaluasi mikroskopis yang meliputi motilitas massa, motilitas individu, konsentrasi, viabilitas dan abnormalitas spermatozoa (Tabel 4.1).

Tabel 4.1. Rataan kualitas semen segar kambing Boer

Parameter	Rataan
Volume (ml)	0,63±0,15
Konsentrasi (juta/ml)	4546,67±611,01
Konsistensi	Pekat
Warna	Putih susu-Putih kekuningan
Bau	Amis khas hewan
pH	7
Motilitas massa	3+
Motilitas individu (%)	71,33±1,15
Viabilitas (%)	93,17±0,58
Abnormalitas (%)	3,67±0,76

Volume semen kambing Boer yang diperoleh dari hasil pengambilan memiliki rata-rata adalah 0.63±0.15ml. Volume semen kambing Boer dewasa di Indonesia seharusnya berkisar antara 0,70-1,50 ml [14] sedangkan jumlah kisaran normal volume semen kambing secara umum yaitu antara 0,5-1,5 ml/ejakulat [8]. Jumlah rata-rata volume semen kambing Boer pada penelitian ini masih normal jika dibandingkan dengan volume semen kambing secara umum. Konsentrasi sperma tinggi yaitu

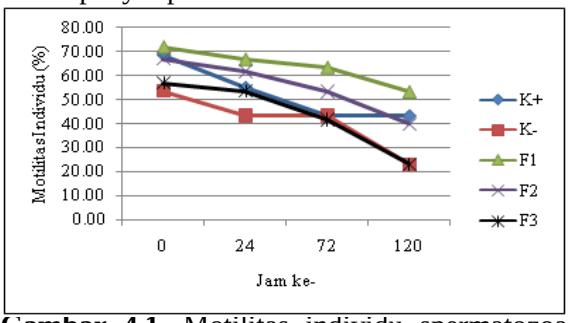
4546,67±611,01 juta/ml, Rata-rata konsentrasi spermatozoa kambing Boer yang telah diperiksa pada penelitian ini masih dalam kisaran normal yaitu antara 2500-5000 juta/ml [2].

Warna semen kambing Boer pada penelitian ini adalah putih susu-putih kekuningan. Selain konsistensi bau semen kambing juga amis khas hewan yang artinya bau tersebut sesuai dengan hewan yang diambil semennya. Umumnya bau semen dinyatakan dengan bau khas [5]. Selanjutnya pemeriksaan pH menunjukkan bahwa pH semen kambing Boer adalah 7,00 yang berarti netral, karena berdasarkan beberapa penelitian semen kambing memiliki pH antara 5,9-7,3 [4].

Motilitas massa yang teramati pada pemeriksaan sebelum perlakuan adalah 3+. Hasil motilitas individu juga mendukung kualitas motilitas massa dengan rata-rata 71,33±1,15 yang menunjukkan bahwa spermatozoa sangat progesif dan didukung dengan adanya pergerakan massa. Kualitas semen dapat dikatakan baik apabila memiliki motilitas >50% [7] dan kisaran normalnya adalah 60-80% [4]. Rata-rata viabilitas atau daya hidup spermatoza yaitu 93,17±0,58% yang menunjukkan bahwa kualitas spermatoza baik. Semen normal memiliki presentase hidup minimal 50% [15]. Abnormalitas pada pemeriksaan ini adalah 3,67±0,76% sehingga semen tersebut masih dapat digunakan untuk proses selanjutnya.

Kualitas motilitas individu setelah perlakuan dan penyimpanan secara umum menunjukkan adanya beda nyata (P<0,05) namun jika dibandingkan secara spesifik berdasarkan jam pengamatan dan perlakuan hanya terdapat kecenderungan peningkatan dan penurunan kualitas motilitas (Gambar 4.1). Antara pengencer F1 dan F2 jika dibandingkan dengan pengencer K+ memiliki kecenderungan kualitas motilitas individu selama penyimpanan yang sama, meskipun pada jam ke-72 motilitas individu dengan perlakuan K+ menurun, sehingga kemungkinan adanya lesitin pada susu kedelai bubuk dengan konsentrasi yang sesuai pada pengencer F1 dan F2 tetap mampu melindungi spermatozoa selama penyimpanan suhu 4 ^{o}C. Kualitas motilitas individu dengan perlakuan pegencer F3 dan K- memiliki kecenderungan yang sama yaitu terjadi penurunan kualitas motilitas individu spermatozoa selama penyimpanan.

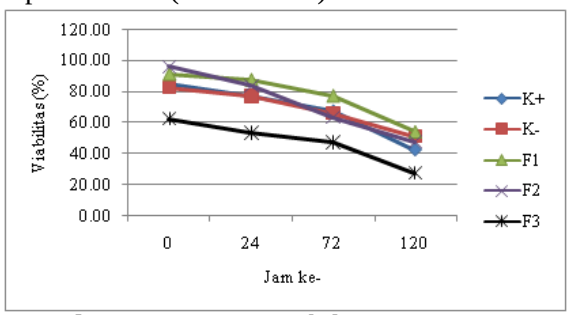
Tingginya konsentrasi susu kedelai yaitu 6% pada pengencer F3 dimungkinkan mengakibatkan banyaknya gumpalan susu kedelai pada medium sehingga mempengaruhi pergerakan spermatozoa, sedangkan pengencer K- tidak mengandung susu kedelai yang memungkinkan membran spermatozoa tidak terlindungi secara maksimal karena tidak adanya lesitin untuk mengurangi *cold shock* ketika penyimpanan suhu 4 ^{o}C.



Gambar 4.1. Motilitas individu spermatozoa berdasarkan perlakuan dan waktu penyimpanan

Lamanya penyimpanan spermatozoa berpengaruh terhadap penurunan motilitas spermatozoa,. Kualitas motilitas individu masih cukup baik pada jam ke-120 dengan perlakuan F1, F2 dan K+ karena masih berada pada kisaran 40%, sedangkan kisaran 40% dengan perlakuan F3 dan K- hanya sampai jam ke-72. Standar motilitas yang banyak digunakan dalam program IB harus memiliki persentase motilitas paling sedikit sebesar 40% [15].

Evaluasi terhadap viabilitas (daya hidup) dari spermatozoa setelah perlakuan secara umum menunjukkan adanya beda nyata (P<0,05), namun jika dibandingkan secara spesifik berdasarkan jam pengamatan dan perlakuan hanya terdapat kecenderungan peningkatan dan penurunan kualitas viabilitas spermatozoa (Gambar 4.2).

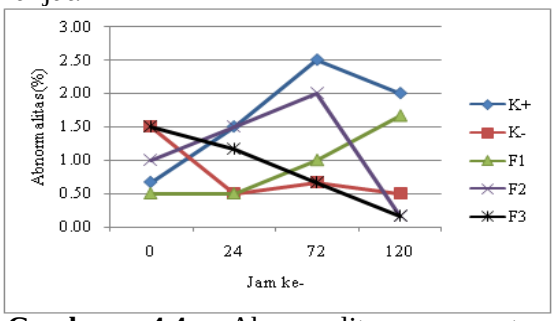


Gambar 4.2. Viabilitas spermatozoa berdasarkan perlakuan dan waktu penyimpanan

Viabilitas spermatozoa dengan perlakuan F1 dan F2 memiliki persamaan mempertahankan kualitas viabilitas

spermatozoa, namun pada jam ke-72 viabilitas spermatozoa dengan perlakuan F2 mengalami penurunan dan mengalami peningkatan lagi pada jam ke-120. Viabilitas spermatozoa dengan perlakuan K+ dan K- tidak memiliki beda nyata meskipun pada pengencer K- tidak mengandung lesitin. Kemungkinan adanya sitrat pada pengencer K- yang berfungsi sebagai buffer mampu menjaga konsentrasi ion kalsium pada spermatozoa sehingga secara fisiologis spermatozoa tidak memproduksi ATP secara berlebihan untuk menekan kinerja permeabilitas membran spermatozoa yang tinggi ketika harus berada pada lingkungan yang dingin selama penyimpanan. Pengenceran dengan menggunakan sitrat mampu meningkatkan perbaikan daya hidup spermatozoa dalam penyimpanan selama 180 jam pada suhu 5 ^{o}C [10].

Evaluasi terhadap abnormalitas spermatozoa setelah perlakuan secara umum menunjukkan adanya beda nyata (P<0,05), namun jika dibandingkan secara spesifik berdasarkan jam pengamatan dan perlakuan hanya terdapat kecenderungan peningkatan dan penurunan kualitas abnormalitas spermatozoa (Gambar 4.4). Kualitas abnormalitas dengan perlakuan pengencer F3 rata-rata hampir sama dengan pengencer K-. Kenaikan abnormalitas yang terjadi pada perlakuan K+, F1, dan F2 yang terlihat pada jam ke-72 dan ke-120 kemungkinan karena terlalu padatnya spermatozoa yang masih hidup pada penyimpanan jam ke-72 menjadikan banyaknya gesekan yang terjadi antar spermatozoa lalu menyebabkan kerusakan struktur morfologi spermatozoa, namun hal ini perlu dikaji lebih lanjut.

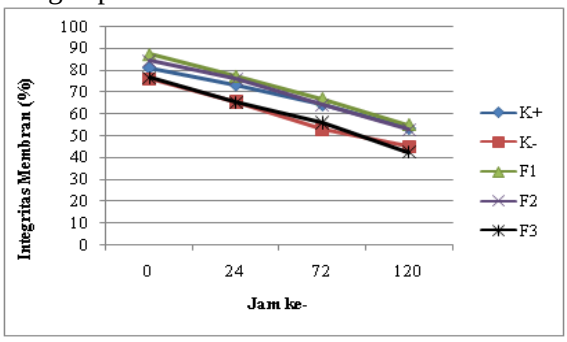


Gambar 4.4. Abnormalitas spermatozoa berdasarkan perlakuan dan waktu penyimpanan

Lama penyimpanan juga mempengaruhi kenaikan abnormalitas semakin lama masa penyimpanan spermatozoa maka akan memicu kenaikan abnormalitas. Hal tersebut terlihat ketika pengamatan jam ke-72 dan ke-120 dengan perlakuan F1, F2 dan K+ karena adanya kenaikan abnormalitas yang didukung dengan tingkat viabilitas dan motilitas yang masih cukup baik selama penyimpanan tersebut, namun hal ini masih perlu di kaji lebih dalam lagi.

Terdapat lima kategori spermatozoa abnormal yang harus diperhatikan dengan presentase abnormalitas yang tidak boleh lebih dari 20% antara lain tidak ada ekor, abnormal kepala, bentuk ekor yang abnormal, bentuk ekor abnormal dengan adanya sitoplasmic droplet pada bagian proksimal, lalu abnormalitas pada ekor dengan distal droplet [13]. Abnormalitas yang ditemukan pada penelitian ini antara lain kepala yang kecil dan ramping, sehingga dapat dikategorikan sebagai abnormalitas primer dan ekor yang melengkung, serta terputusnya kepala dari ekor sehingga dikategorikan sebagai abnormalitas sekunder spermatoza.

Evaluasi terhadap integritas membran spermatozoa setelah perlakuan secara umum menunjukkan adanya beda nyata (P<0,05), namun jika dibandingkan secara spesifik berdasarkan jam pengamatan dan perlakuan hanya terdapat kecenderungan peningkatan dan penurunan kualitas integritas membran spermatozoa (Gambar 4.6). Kualitas integritas membran masih cukup baik dengan perlakuan F1, F2, dan K+ ketika penyimpanan jam ke-0 sampai ke-120, meskipun selama penyimpanan mengalami penurunan. Integritas membran dengan perlakuan F3 dan K- memiliki kualitas yang sama karena adanya penurunan kualitas dibandingkan dengan perlakuan lainnya, namun pada jam ke-0 kualitas integritas membran dengan perlakuan F3 tidak berbeda nyata dengan perlakuan K+ dan F2.



Gambar 4.6. Integritas membran spermatozoa berdasarkan perlakuan dan waktu penyimpanan.

Kenaikan konsentrasi susu kedelai juga kemungkinan menyebabkab perubahan pH

ketika penyimpanan dalam waktu yang lama, perubahan pH akan mengganggu fungsi membran dari sel spermatozoa karena harus menyeimbangkan tekanan osmotik di dalam dan diluar sel. Konsentrasi susu kedelai yang tinggi pada pengencer F3 menyebabkan perubahan tekanan osmotik yaitu fenomena hipertonik, ketika konsentrasi larutan diluar sel tinggi akan menyebabkan sel mengeluarkan lebih banyak air dan akhirnya mengkerut peristiwa inilah yang mengindikasikan bahwa terjadi perubahan fungsi membran ada sel spermatozoa ketika disimpan pada suhu 4 ^{o}C dengan konsentrasi bahan terlarut yang tinggi.

Adanya kandungan protein dan lipid yang sesuai memungkinkan membran spermatozoa masih terlindungi secara utuh selama penyimpanan. Fosfolipid termasuk lesitin jika ditambahkan air maka molekul-molekul tersebut akan berkumpul dengan sendirinya dan akan membentuk agregat yang melindungi bagian hidrofobiknya [1]. Beberapa laporan menunjukkan bahwa lesitin pada pengencer akan berikatan dengan membran plasma sehingga mampu mempertahankan konsentrasi kalsium saat pendinginan. Berdasarkan hal tersebut apabila kandungan kalsium intraseluler dalam sel spermatozoa tetap stabil maka permeabilitas membran sel juga akan stabil, sehingga proses kapasitasi dini dapat diminimalisir [16].

Kandungan asam sitrat pada pengencer sitrat juga berpengaruh positif terhadap motilitas spermatozoa. Asam sitrat merupakan senyawa kimia yang dapat digunakan sebagai buffer yang mampu mempertahankan tekanan osmotik dan keseimbangan elektrolit, karena mengandung ion yang diperlukan spermatozoa untuk menjaga kestabilan membran sel. Ion sitrat akan mampu berikatan dengan Ca yang terdapat pada plasma [10]. Berdasarkan hal tersebut adanya pengikatan Ca oleh ion sitrat akan menghambat pembentukan ATP menjadi cAMP yang dikatalis Adenosin siklase (AC) selama penyimpanan sehingga menghambat produksi energi untuk motilitas spermatozoa yang menyebabkan proses kapasitasi dini tidak akan terjadi, selain itu ketika proses thawing asam sitrat akan terurai menjadi karbondioksida dan air sehingga ion Ca yang berikatan akan dilepaskan dan memodulasi motilitas sperma kembali.

Adanya penurunan viabilitas spermatozoa dapat disebabkan oleh tingginya persentase campuran bahan pengencer yang akan menimbulkan peningkatan asam laktat yang lebih besar sehingga terjadi perubahan keasaman dan menurunkan daya hidup spermatozoa [12]. Saat konsentrasi kedelai dinaikkan maka akan memiliki efek negatif terhadap kualitas spermatozoa dan motilitas spermatozoa akan menurun ketika konsentrasi lesitin pada pengencer lebih tinggi [9]. Sel hewan tidak memiliki dinding sel sehingga tidak dapat menerima penyerapan atau pelepasan air secara berlebihan ketika dalam kondisi lingkungan hipotonik atau hipertonik harus memiliki adaptasi khusus untuk osmoregulasi [1].

KESIMPULAN

Pengencer F1 dan F2 mampu mempertahankan kualitas motilitas individu, viabilitas dan integritas membran spermatozoa selama penyimpanan jam ke-0, ke-24, ke-72, dan ke-120. Adanya kandungan lesitin pada susu kedelai mampu melindungi spermatozoa dari cekaman dingin (*cold shock*) selama penyimpanan pada suhu 4 ^{o}C. Kualitas abnormalitas dengan perlakuan F1 dan F2 cukup tinggi pada penyimpanan jam ke-72 berkorelasi dengan tingginya motilitas dan viabilitas, hal ini kemungkinan menyebabkan gesekan antar spermatozoa sehingga mengakibatkan kenaikan abnormalitas namun fenomena ini perlu dikaji lebih lanjut. Kandungan susu kedelai bubuk dengan tingkat konsentrasi tinggi pada pengencer F3 kemungkinan menyebabkan adanya gumpalan lemak susu kedelai bubuk selama peyimpanan sehingga menyebabkan perubahan pH pada media dan mempengaruhi tekanan osmotik pada membran spermatozoa, lalu menyebabkan penurunkan kualitas spermatozoa selama penyimpanan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Bapak Dr. Agung Pramana W. M. M.Si selaku pembimbing pertama dan Bapak Dr. Ir. Gatot Ciptadi, DESS selaku pembimbing kedua, serta Bapak Dr. Aris Soewondo selaku penguji. Ibu Setyawati, mbak susi, dan Bapak Harmaji selaku laboran di Jurusan Biologi Universitas Brawijaya, Malang. Bapak Sumali selaku laboran di Laboratorium Sumbersekar, Batu.

DAFTAR PUSTAKA

[1] Campbell, N.A., J.B. Reece, dan L.G. Mitchell. 2002. Biologi. Ed ke-5. Jilid I. Erlangga. Jakarta

[2] Evans, W.H. dan Maxwell, J.M. 1987. Membran Structure and Function. IRL Press. Oxford University. Oxford:11-28.

[3] Greyling, J.P.C. 2000. Reproduction Traits in the Boer Goat Does. Small Rumin. Res. 36:171-177.

[4] Hafez, E.S.E. 2000. X and Y Chromosome Bearing Spermatozoa. In Reproduction in Farm Animal. Lea and Febiger. Philadelphia.

[5] Herdis dan M. Rizal. 2008. Inseminasi Buatan pada Domba. Rineka Cipta. Jakarta

[7] Lopes, F.P. 2002. Semen Collection and Evaluation in RAM ANS 33161. University of Florida.

[8] Partodihardjo, S. 1992. Ilmu Reproduksi Hewan. Mutiara Sumber Widya. Jakarta.

[9] Rehman, F.U., M.S. Qureshi dan R.U. Khan. 2014. Effect of Soybean Based Extenders on Sperm Parameters of Holstein-Friesian Bull Durung Liquid Storage at 4 ^{o}C. Pakistan J. Zool. 46:185-189.

[10] Salisbury, G.W., N.L. Vandenmark, dan R. Djanuar. 1985. Fisiologi Reproduksi dan Inseminasi Buatan pada Sapi. Gdjah Mada University Press. Yogyakarta.

[11] Shurtleff, W. Dan Aoyagi. 2004. Soyfoods Center: A Chapter From the Unpublished Manuscript History of Soybeans and Soyfoods. Layalette. California.

[12] Situmorang, P. 1992. Pengaruh Pengencer Glucerol dan Toingkat Kuning Telur Terhadap Daya Hidup Spermatozoa. Ilmu dan Peternakan. 5:1.

[13] Susilawati, T. 2011. Spermatologi. UB Press. Malang

[14] Suyadi, Susilawati,T. Dan Isnaini, N. 2004. Uji Coba Produksi Semen Beku Kambing Boer. Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya. Malang.

[15] Toelihere, M.R. 1993. Inseminasi Buatan Pada Ternak. Angkasa. Bandung

[16] White, I.G. 1993. Lipid and Calcium Uptake of Sperm in Relation to Cold Shock and Preservation : A review. Reproduction and Fertility Development. 5:639-658.