

Full Paper

KARAKTERISASI TIGA LOKUS MIKROSATELIT PADA TELUR DAN LARVA TUNA SIRIP KUNING, *Thunnus albacares*

CHARACTERIZATION OF THREE MICROSATELLITE LOCI OF YELLOW FIN TUNA, *Thunnus albacares* EGGS AND LARVAE

Sari B. Moria*, Gusti N. Permana dan Jhon H. Hutapea

Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut Gondol
Dusun Gondol, Desa Penyabangan, Kecamatan Gerokgak, Kabupaten Buleleng, Bali 81105
*Penulis untuk korespondensi, E-mail: moriasembiring@yahoo.co.id

Abstract

Characterization of three microsatellite loci are able to provide information about genetic variation or polymorphism of yellow fin tuna eggs and larvae produced by domestication of broodstock. Thirty samples of eggs and larvae were collected from different spawning day and analyzed. Amplification of those three loci were carried out with multiflexing technique and electrophoreted ABI Prism 310 Genetic Analyzer sequencer. From those three loci were used (*Ttho-1*, *Ttho-4* and *Ttho-7*) showed that locus *Ttho-7* had higher genetic variance (0.720-1.212) compared to other loci. Based on the result, it can be concluded that high allele frequency as showed at *Ttho-7* could be used as marker for a parental analysis.

Key words: characterization, genetic diversity, microsatellite, yellow fin tuna

Pengantar

Metode yang berbasis PCR (*Polymerase Chain Reaction*) untuk mempelajari keragaman genetik suatu individu telah banyak berkembang seperti RAPD (*Random Amplified Polymorphism DNA*), RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) dan ISSR/SSRs (*Inter Simple Sequence Repeats*). Tiap teknik tidak hanya berbeda dalam metode amplifikasinya tetapi juga berbeda dalam jumlah pola pita yang dihasilkan. Jumlah pola pita yang dihasilkan dengan teknik RAPD atau ISSR/SSRs lebih sedikit bila dibanding dengan RFLP atau AFLP. Biasanya sebanyak 50-100 pola pita teramplifikasi pada AFLP yang hasilnya divisualisasikan pada *denaturing polyacrylamide gel* (Vos *et al.*, 1995), sedangkan pada RAPD atau ISSR, jumlah pita yang teramplifikasi hanya sedikit (kurang dari 20 pola pita) dan visualisasi dapat dilakukan pada agarose gel.

Mikrosatelit/SSR merupakan marker yang berkembang lebih akhir dibanding RAPD dan RFLP serta dapat pula digunakan untuk mempelajari keragaman genetik pada ikan. Mikrosatelit merupakan pengulangan mono, di atau trinucleotida yang biasanya terdiri atas 4-10 unit pengulangan, membentang pada utas DNA. Susunan basa yang demikian merupakan karakteristik dari nuklear genom dan bervariasi antar spesies atau populasi.

Kelebihan utama penanda mikrosatelit terletak pada sifat polimorfisme dan daya pembedanya yang

tinggi. Sifat tersebut dapat dikembangkan sebagai alat identifikasi genotip, deteksi penyakit genetik dan analisis kekerabatan (Schloetterer & Pemberton, 1996). Penanda mikrosatelit yang memiliki nilai *Polymorphic Information Content* (PIC) > 0,5 (Vanhalala *et al.*, 1998) juga dapat digunakan untuk menyusun pemetaan QTL (*Quantitative Trait Loci*) atau peta pautan (Morgante & Oliveri, 1994), yang selanjutnya dapat dikembangkan sebagai MAS (*Marker Assisted Selection*) (Prasetyono & Tasliah, 2004).

Meskipun demikian mikrosatelit juga memiliki kekurangan yaitu perancangan lokus/primer yang spesifik membutuhkan waktu lama dan biaya yang besar (Powell *et al.*, 1996). Pendekatan termudah adalah melalui pencarian *database* dengan bantuan komputer dan internet akan menghasilkan beberapa sekuen mikrosatelit yang dapat dirancang lokus/primernya. Cara lain adalah dengan menggunakan lokus yang berasal dari spesies yang masih berkerabat dekat dengan spesies yang akan diuji (Broughton & Gold, 1997).

Rintisan perbenihan tuna sirip kuning telah dimulai di Indonesia sejak 2003 dan hasil-hasil yang telah dicapai antara lain pengembangan teknik penangkapan calon induk (Hutapea *et al.*, 2003), ukuran optimum calon induk (Hutapea *et al.*, 2007a), teknik pembesaran calon induk dalam bak beton (Hutapea *et al.*, 2005), variasi genetik tuna sirip kuning (Permana *et al.*, 2007) dan pengamatan perkembangan embrio

(Hutapea et al., 2007b). Tujuan penelitian ini adalah mengembangkan sistem penanda molekular mikrosatelit untuk analisis keragaman genetik tuna sirip kuning, *Thunnus albacares*.

Bahan dan Metode

Penelitian dilakukan di Laboratorium OFCF Tuna BBRPBL Gondol, Bali meliputi pemeliharaan induk dan larva. Induk yang digunakan dipelihara dalam bak beton volume 1500 m³ dengan sistem pergantian air semi tertutup. Jumlah induk yang dipelihara berkisar antara 30-35 ekor dengan ukuran 30-60 kg/ekor, dan perkiraan umur antara 3-5 tahun. Telur dan larva yang digunakan untuk penelitian ini berasal dari pemijahan induk pada bulan Agustus – Oktober tahun 2005. Sampel-sampel tersebut diawetkan dengan 20% larutan DMSO (*Dimethyl Sulfoxide*) dalam 30% NaCl dan selanjutnya dianalisa di Laboratorium *Japan Sea National Fisheries Research Institute, Fisheries Research Agency, Suido-cho, Nigata-shi, Jepang*, pada Oktober – Desember 2005.

Genomic DNA diisolasi dan dipurifikasi menggunakan Metode *Dneasy Tissue for DNA Purification* (Qiagen). Untuk mengetahui konsentrasi DNA dalam larutan kemudian diukur dengan alat *GeneQuant RNA/DNA Calculator*. Tingkat kemurnian DNA hasil isolasi dan purifikasi sebesar 1,8-2,0 pada rasio λ 260 nm/280 nm.

Sampel diamplifikasi dengan 3 lokus mikrosatelit yaitu *Ttho-1*, *Ttho-4* dan *Ttho-7* (Tabel 1). Sekuen dari lokus ini merupakan hasil cloning dari *Thunnus thynnus orientalis* di Jepang (Takagi et al., 2003). Reaksi PCR dilakukan dengan teknik *multiplexing* yaitu menggabungkan ketiga lokus mikrosatelit dalam satu kali reaksi yang sama, dimana salah satu dari setiap pasang primer untuk setiap lokus dilabel dengan fluorescen. Untuk amplifikasi menggunakan *Takara Ex Taq™ HotStart Version* dengan total campuran dalam setiap reaksi PCR adalah 15 μ l yang terdiri dari 15-50 ng genomic DNA dan 5 pmol primer mikrosatelit.

Amplifikasi menggunakan thermocycler *GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems)*. Kondisi PCR untuk ketiga lokus mikrosatelit dengan prosedur *step down*: denaturasi awal 95°C selama 15 menit, 7 siklus (94°C selama 1 menit, 52°C selama 30 detik 72°C selama 30 detik), 35 siklus (90°C selama 30 detik, 52°C selama 30 detik dan 72°C selama 30 detik).

Hasil PCR dengan primer mikrosatelit kemudian diseparasi menggunakan mesin elektroforesis kapiler *ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)*. Hasil elektroforesis dianalisis menggunakan *software GeneScan 2.1* untuk mengetahui fragmen-fragmen yang dihasilkan proses elektroforesis. Data fragmen-fragmen yang dihasilkan oleh *GeneScan* kemudian dipindahkan ke program *Genotyper 2.5 (Applied Biosystems)* untuk menganalisis ukuran fragmen-fragmen hasil elektroforesis tersebut. Hasil pembacaan ukuran fragmen (*scoring*) setiap primer (lokus) diinterpretasikan sebagai alel. Data ukuran fragmen tersebut disimpan dalam bentuk tabel yang dapat diakses menggunakan program *Microsoft Excel*.

Data yang diperoleh dari hasil interpretasi fragmen-fragmen yang muncul selanjutnya digunakan untuk mengukur beberapa parameter keragaman genetik meliputi: jumlah dan frekuensi alel serta variabilitas (Ho/He). Variabilitas keragaman genetik dihitung berdasarkan Nei (1987) dengan menggunakan program *TFPGA (Tools for Population Genetic Analysis)*.

Hasil dan Pembahasan

Penanda mikrosatelit merupakan penanda yang sangat polimorfik dibandingkan dengan penanda yang lain (Hancock, 1999). Tingkat polimorfisme yang tinggi pada mikrosatelit diharapkan dapat memberikan informasi mengenai keragaman genetik yang lebih baik daripada penggunaan penanda yang lain.

Semua lokus yang digunakan (*Ttho-1*, *Ttho-4* dan *Ttho-7*) bersifat polimorfik pada semua sampel yang diuji dan secara total ditemukan 102 alel dengan rerata 6-11 alel per lokus (Tabel 2). Lokus yang

Tabel 1. Primer yang digunakan untuk amplifikasi mikrosatelit telur dan larva tuna sirip kuning.

No.	Primer	Sekuens	Pola ulangan
1.	<i>Ttho-4</i>	F= CCTTCATCTTCAGTCCCATC R= CTGTTTCATCTGTTTCGCCC	(CA)
2.	<i>Ttho-6</i>	F= TTCTGCTTCTTTCTTCTGG R= GAAAACACAGGGATTATGG	(CA)
3.	<i>Ttho-7</i>	F= ACTGGATGAAAGGCGATTAC R= ACAGAGGAGCATAACAGAAAC	(CA)

memberikan polimorfisme tertinggi adalah lokus *Ttho-7* dengan nilai sebesar 46,5%, sedangkan lokus yang mempunyai tingkat polimorfisme terendah adalah lokus *Ttho-1* dengan nilai sebesar 18,6%. Pada Tabel 2, juga terlihat jumlah alel yang terdeteksi pada lokus *Ttho-7* cukup tinggi dengan rerata jumlah alel per lokus sebesar 14 dibandingkan dengan lokus *Ttho-1* sebesar 6 dan lokus *Ttho-4* sebesar 9. Menurut Senior *et al.* (1998), nilai polimorfik yang tinggi dapat diperoleh jika jumlah alel rata-rata yang terdeteksi cukup tinggi. Selanjutnya Liu & Cordes (2004) juga menyatakan bahwa jumlah alel per lokus yang besar memberikan nilai *Polymorphisms Information Content* (PIC) yang tinggi juga.

Keragaman genetik berdasarkan variabilitas (H_o/H_e) dari 3 lokus mikrosatelit pada setiap sampel yang dianalisis menunjukkan nilai yang tidak berbeda nyata (Tabel 2). Nilai variabilitas tertinggi diperoleh pada sampel telur (15 Agustus 2005) sebesar 1,149 sedangkan nilai terendah terdapat pada sampel telur (30 Agustus 2005) sebesar 0,725 dan sampel telur (16 Oktober 2005) sebesar 0,746. Perbedaan keragaman

genetik antar sampel dengan waktu pemijahan yang berbeda menunjukkan bahwa induk yang memijah mungkin berbeda baik jumlah maupun individunya.

Nilai keragaman genetik berdasarkan analisis sampel telur dan larva tuna menunjukkan bahwa tuna mempunyai tingkat keragaman genetik yang lebih tinggi dibandingkan dengan ikan laut lainnya seperti ikan kakap merah sebae, *Lutjanus malabaricus* (Permana *et al.*, 2003) dan ikan kerapu sunu, *Plectropomus leopardus* (Andamari *et al.*, 2004). Perbedaan ini mungkin tergantung pada sifat penyebaran tuna yang bersifat migrasi dan bergerombol cenderung menghasilkan nilai keragaman genetik yang lebih tinggi dibandingkan dengan kerapu dan kakap yang relative hidup dalam kelompok dan wilayah tertentu.

Mikrosatelit sebagai penanda kodominan dapat memberikan informasi mengenai pasangan alel dari setiap lokus genetik dari organisme diploid, sehingga penanda mikrosatelit juga dapat digunakan dalam analisis parental (Gerber *et al.*, 2000). Walaupun pada penelitian ini induk tuna sirip kuning yang ada

Tabel 2. Keragaman mikrosatelit telur dan larva tuna sirip kuning (*Thunnus albacares*).

		<i>Ttho-1</i>	<i>Ttho-4</i>	<i>Ttho-7</i>	Rata-rata
Telur (15 Agst 2005)	Jumlah sampel	(30)	(30)	(30)	
	Ukuran alel (bp)	186-194	140-150	202-231	
	Jumlah alel	7	10	13	10
	Variabilitas				
	(H_o)	0,867	0,833	0,933	0,878
	(H_e)	0,710	0,822	0,770	0,767
	(H_o/H_e)	1,221	1,013	1,212	1,149
Telur (30 Agst 2005)	Jumlah sampel	(20)	(20)	(20)	
	Ukuran alel (bp)	188-194	142-152	200-213	
	Jumlah alel	5	8	5	6
	Variabilitas				
	(H_o)	0,500	0,950	0,150	0,533
	(H_e)	0,710	0,761	0,670	0,714
	(H_o/H_e)	0,704	1,248	0,224	0,725
Telur (16 Okt 2005)	Jumlah sampel	(20)	(20)	(20)	
	Ukuran alel (bp)	188-193	144-152	200-224	
	Jumlah alel	6	5	10	7
	Variabilitas				
	(H_o)	0,350	0,800	0,550	0,567
	(H_e)	0,766	0,754	0,764	0,761
	(H_o/H_e)	0,457	1,061	0,720	0,746
Larva (6 Sept 2005)	Jumlah sampel	(32)	(32)	(32)	
	Ukuran alel (bp)	186-194	126-155	202-231	
	Jumlah alel	6	13	14	11
	Variabilitas				
	(H_o)	0,688	0,594	0,906	0,729
	(H_e)	0,733	0,843	0,778	0,785
	(H_o/H_e)	0,939	0,705	1,165	0,936

di BBRPBL Gondol-Bali tidak dianalisis, namun berdasarkan frekuensi alel yang muncul pada lokus *Ttho-1* dan *Ttho-7* dari hasil analisis telur dan larva dapat diprediksi induk yang memijah (Tabel 3).

Berdasarkan Tabel 3 dapat diduga bahwa telur hasil pemijahan tanggal 15 Agustus 2005 mempunyai induk yang sama dengan larva tanggal 6 September 2005

karena frekuensi alel yang tertinggi pada lokus *Ttho-1* terdapat pada ukuran alel yang sama, yaitu 188 bp. Demikian juga pada lokus *Ttho-7* menunjukkan bahwa telur hasil pemijahan tanggal 15 Agustus 2005 mempunyai induk yang sama dengan larva tanggal 6 September 2005 karena frekuensi alel yang tertinggi terdapat pada ukuran alel yang sama, yaitu 204 bp.

Tabel 3. Frekuensi alel dari ketiga lokus mikrosatelit telur dan larva tuna sirip kuning.

Lokus	Allel (bp)	Telur (15 Agst 2005)	Telur (30 Agst 2005)	Telur (16 Okt 2005)	Larva (6 Sept 2005)
<i>Ttho-1</i>	186	0,017	0,000	0,000	0,081
	187	0,033	0,000	0,000	0,000
	188	0,400	0,425	0,200	0,387
	190	0,333	0,275	0,400	0,274
	191	0,050	0,075	0,075	0,065
	192	0,100	0,500	0,150	0,177
	193	0,000	0,000	0,075	0,000
	194	0,067	0,073	0,100	0,016
<i>Ttho-4</i>	126	0,000	0,000	0,000	0,032
	140	0,083	0,000	0,000	0,000
	141	0,017	0,000	0,000	0,032
	142	0,033	0,050	0,000	0,081
	143	0,033	0,000	0,000	0,048
	144	0,250	0,300	0,400	0,306
	145	0,033	0,000	0,000	0,081
	146	0,067	0,125	0,175	0,081
	147	0,100	0,025	0,000	0,000
	148	0,283	0,350	0,250	0,145
	150	0,100	0,050	0,150	0,129
	151	0,000	0,050	0,000	0,016
	152	0,000	0,050	0,025	0,016
	154	0,000	0,000	0,000	0,016
155	0,000	0,000	0,000	0,016	
<i>Ttho-7</i>	200	0,000	0,050	0,300	0,000
	201	0,000	0,000	0,050	0,000
	202	0,167	0,475	0,350	0,177
	203	0,000	0,225	0,000	0,032
	204	0,417	0,225	0,125	0,403
	208	0,017	0,000	0,000	0,016
	210	0,017	0,000	0,000	0,000
	211	0,000	0,000	0,025	0,000
	212	0,017	0,000	0,025	0,016
	213	0,033	0,025	0,050	0,016
	214	0,100	0,000	0,025	0,081
	215	0,017	0,000	0,000	0,000
	217	0,033	0,000	0,000	0,016
	218	0,000	0,000	0,000	0,016
	219	0,083	0,000	0,025	0,032
	221	0,067	0,000	0,000	0,032
	223	0,017	0,000	0,000	0,016
224	0,000	0,000	0,025	0,000	
229	0,000	0,000	0,000	0,016	
231	0,017	0,000	0,000	0,129	

Sedangkan telur hasil pemijahan tanggal 30 Agustus 2005 dan 16 Oktober 2005 juga diduga merupakan hasil pemijahan induk yang betina yang sama karena frekuensi alel yang tertinggi terlihat pada ukuran alel 202 bp. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Permana *et al.* (2004) yang menunjukkan bahwa induk betina tuna sirip kuning dengan nomor *tagging* 4213601A0E dan 4213683511 terus memijah mulai bulan Agustus sampai Desember 2005.

Berdasarkan hasil analisis keragaman genetik dan analisis parental, maka penanda mikrosatelit juga dapat digunakan dalam program pemuliaan atau studi evolusi dan mudah diaplikasikan karena berbasis teknik PCR. Hal ini sesuai dengan pendapat O'Reilly & Wright (1995), yang menyatakan bahwa penanda mikrosatelit semakin meningkat pemanfaatannya dalam perikanan dan budidaya untuk pemetaan genetik, analisis keragaman genetik dan studi evolusi. Demikian juga Schlotterer & Pemberton (1996) yang menyatakan bahwa mikrosatelit merupakan alat bantu yang sangat akurat untuk membedakan genotipe, evaluasi kemurnian turunan, pemetaan dan seleksi genotipe untuk karakter yang diinginkan.

Kesimpulan

1. Locus mikrosatelit *Ttho-7* mempunyai tingkat polimorfik yang tinggi dibandingkan kedua locus mikrosatelit yang lainnya (*Ttho-1* dan *Ttho-4*).
2. Berdasarkan frekuensi alel yang tinggi pada locus mikrosatelit *Ttho-7*, maka locus *Ttho-7* tersebut dapat digunakan sebagai penanda dalam analisis parental.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Mr. Akio Nakazawa sebagai *Chief Expert Overseas Fishery Cooperation Foundation* (OFCF) Japan atas pendanaan dari penelitian ini, serta Mr. Tetsuo Fujii dan Staf Peneliti serta Teknisi di *Laboratorium Japan Sea National Fisheries Research Institute, Fisheries Research Agency, Suido-cho, Nigata-shi, Japan* dengan segala fasilitas, dan bantuan dalam pelaksanaan penelitian ini.

Daftar Pustaka

Andamari, R., Haryanti, K. Suwiryana, S.B. Moria & G.N. Permana. 2004. Bioreproduksi dan karakteristik variasi genetik ikan kerapu sunu,

Plectropomus leopardus. Laporan Teknis Proyek Riset Perikanan Budidaya Laut Gondol-Bali. Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut Gondol-Bali. 12 p.

- Broughton, R.E. & J.R. Gold. 1997. Microsatellite development and survey of variation in northern Bluefin Tuna (*Thunnus thynnus*). *Mol.Mar.Biol. Biotechnol.* 6:308-314.
- Gerber, S., S. Mariette, R. Streiff, C. Bodenes & A. Kremer. 2000. Comparison of microsatellites and amplified fragment length polymorphism markers for parentage analysis. *Molecular Ecology* 9:1037-1048.
- Hancock, J.M. 1999. Microsatellite and other Simple Sequence: Genomic Context and Mutational Mechanisms. In Goldstein, D.B. & Schlotterer, C. (eds). *Microsatellites: Evolution and Application*. Oxford University Press.
- Hutapea, J.H., I.G.N Permana, A. Nakazawa & T. Kitagawa. 2003. Preliminary Study of Yellowfin Tuna (*Thunnus albacares*) Capture for Candidate Broodstock. *Proceeding International Marine and Fisheries Seminar*. Jakarta, December 15-16th 2003. Section 1, p.31-33.
- Hutapea, J.H., I.G.N Permana, A. Nakazawa & T. Kitagawa. 2005. Manajemen Pemeliharaan Induk Tuna Sirip Kuning (*Thunnus albacares*) Dalam Bak Beton Secara Terkontrol. Laporan Akhir Riset T.A. 2005. Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut, Gondol Bali (Unpublished).
- Hutapea, J.H., I.G.N Permana & R. Andamari. 2007a. Optimum Captured Size of Yellowfin Tuna (*Thunnus albacares*) Broodstock. *Prosiding Aquakulture Indonesia*, 5-7 Juni 2007. Surabaya. Hal. 312-317.
- Hutapea, J.H. 2007b. Embryo development of Yellowfin Tuna (*Thunnus albacares*) at different incubation temperature. *Ind. Aqua. Journal* 2 (2): 99-105.
- Liu, Z.J. & J.F. Cordes. 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture* 238: 1-37.
- Morgante, M. & A.M. Olivieri. 1994. Amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant Journal* 3: 175-182.
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press. New York.

- O'Reilly, P. & J.M. Wright. 1995. The evolving technology of DNA fingerprinting and its application to fisheries and aquaculture. *J Fish Biol.* 47(supA) 29–55.
- Permana, G.N., S.B. Moria, Haryanti & K. Sugama. 2003. Genetic identification and variation of Red Snapper, *Lutjanus* sp. through allozyme electrophoretic analysis. *Indonesian Fisheries Research Journal* 9 (1) 33-40.
- Permana, G.N., J.H. Hutapea, Haryanti & S.B.M. Sembiring. 2007. Variasi genetik Tuna Sirip Kuning, *Thunnus albacares* dengan analisis elektroforesis allozyme dan mt-DNA. *J.Ris. Akuakultur* 2 (1) 41-50.
- Powell, W., G.C. Macharay & J. Provan. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends Plant Sci.* 1: 215-222.
- Prasetyono, J. & Tasliah. 2004. Marka mikrosatelit: marka molekular yang menjanjikan. *Buletin AgroBio.* 6(2) 41-47.
- Schloetterer, C. & J. Pemberton. 1996. The Use of Microsatellite for Genetics Analysis of Natural Population. *Paper on European Union Meeting Molecular Tools for Biodiversity.* December 14th -18th 1996, Vienna.
- Senior, M.L., J.P. Murphy, M.M. Goodman & C.W. Stuber. 1998. Utility of SSRs for determining genetic similarities and relationship in maize using agarose gel system. *Crop Sci.* 38:1088-1098.
- Takagi, M., S. Chow, T. Okamura, V.P. Scholey, A. Nakazawa, D. Margules, J.B. Wexler & N. Taniguchi. 2003. Mendelian inheritance and variation of four microsatellite DNA markers in the Yellowfin Tuna, *Thunnus albacares*. *Fisheries Science* 69:1304-1306.
- Vanhala, T., M. Tuiskula-Haavisto, K. Elo, J. Vilkki & A. Maki-Tanila. 1998. Evaluation of genetic variability and genetic distance between eight chicken lines using microsatellite markers. *Poult. Sci.* 77: 783-790.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T.V. Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper & M. Zabeay. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23: 4407– 4414.