

Domestisering av marine arter

Rapport for 2002 utarbeidet av Knut E. Jørstad, Håkon Otterå, Frank Nilsen, Birgitta Norberg, Geir Dahle, Ørjan Karlsen og Anne Berit Skiftesvik

Dette prosjektet skal overvåke og koordinere arbeidet med domestisering av torsk, kveite og hyse. En domestiseringsprosess vil raskere utnytte det potensialet de marine artene har i akvakultur. I en domestiseringsprosess er det viktig å ha et bredt grunnlag for utvelgelse, en genetisk oversikt over stamdyrene og deres avkom. En forutsetning for en domestiseringsprosess er at vi behersker reproduksjon og produksjon av avkom så godt at vi vet at det er genetiske og ikke miljømessige faktorer vi måler på. Det vil derfor være litt ulikt med hensyn på art hvor innsatsen bør ligge ved oppstartning av denne prosessen. For kveite vil mye av innsatsen være konsentrert om reproduksjon, for torsk kartlegging av stammer/stammeegenskaper, for hyse oppbygging av stamfiskbestand og kartlegging av egenskaper.

I dette prosjektet inngår også oppformering av genetisk merket torsk til bruk i oppdrett og forskning, samt kartlegging av torskeparasitter.

Delprosjekt 140701: Domestisering av torsk

Aktivitet i 2002

Prosjektet startet opp i år og formålet er genetisk karakterisering av kysttorsk stammer og sammenligning av vekstegenskaper i kultur. Forutsetningen for det videre arbeid i prosjektet var at en fikk samlet inn tilstrekkelig antall vill stamfisk fra ulike lokaliteter for bruk i sammenliknende studier i 2003 og 2004. Arbeidet i 2002 har derfor i stor grad blitt preget av stort feltaktivitet / toktvirksomhet. Her har en satset på innsamling av levende stamtorsk samtidig som det er samlet inn et prøvematerialet for genetisk karakterisering av utvalgte stammer langs kysten. Prøvetaking på den innsamlede stamfisken ble sterkt forskjøvet på grunn av høye sjøtemperaturer, og de genetiske analysene har derfor blitt noe utsatt.

I juni ble det også utarbeidet en søknad til NFR, hvor mikrosatelitt DNA identifisering av familiegrupper av torsk stod sentralt (”The use of microsatellite DNA profiling to evaluate performance traits for single families and selected strains of cod”). I den forbindelse er det også etablert samarbeid med Fiskeriforsk i Tromsø og University of Sterling i Skottland.

Resultater

Genetisk karakterisering av torskestammer

Undersøkelsene ble gjennomført med ”Fangst” i mars og april. De nordligste prøvene (gyteprøver) var fra Porsangerfjorden og den sørligste fra Tresfjord i Romsdalen. I tillegg ble det tatt prøver på G.O. Sars i Lofoten. Til sammen er det samlet inn ca. 1200. Hemoglobin analysene

ble gjennomført på ferske prøver under de to toktene. Vevsenzymer (allozymer) er analyser ved laboratoriet i Bergen, hvor det også er ekstrahert DNA fra alle prøver.

Innsamling av stamtorsk

Stamfisk ble samlet inn under tokt med Fangst i mars /april. Ved hjelp av innleid snurrevad fartøy ble det fanget inn ca. 400 torsk fra Porsangerfjorden / Magerøysundet. Disse ble overført til anlegg i Hammerfest for oppbevaring inntil transport sørover til Hordaland. Fra Herøy området ble det kjøpt inn ca 170 vill stamtorsk som var fanget med ruser i et avgrenset området. Denne fisken ble fraktet sørover med "Fangst" og fisken overført til anlegget i Parisvatnet. I Øygarden er det også gjennomført et fiske med sikte på stamtorsk. Omtrent 80 fisk er fra denne regionen. Fisken fra Porsangerfjord ble fraktet sørover til Bergen med "M.Sars" i begynnelsen av juli og overført til Parisvatnet, hvor all stamtorsk nå går samlet. De høye temperaturene i sommer har ført til en større avgang av fisk enn forventet. Det ble derfor samlet inn supplerende stamtorsk fra Tysfjord i oktober ("Fangst"). All potensiell stamfisk ble gjennomgått i slutten av november og 241 blir nå vurdert for de planlagte forsøkene i 2003.

Genetisk merket torsk

Resultatene fra utsettingene i PUSH programmet viste at innslaget av genetisk merket torsk var høyest i Heimarkspollen i Austevoll. Det ble derfor satt i gang et rusefiske (høsten 2001) med sikte på innsamling av stamfisk som basis for en etablering av en ny genetisk merket stamtorsk. Dette fisket forsatte i 2003, og det ble fanget inn 161 fisk, vesentlig små fisk. Analysene viste at ingen av disse var genetisk merket, og det var overraskende lav frekvens (0,03) av markør genet i det innsamlete materialet. Dette førte også til en gjennomgang av dataene på genetisk merket torsk i de to andre utsettingsområdene Masfjorden og Øygarden. Det samme nedgangen i frekvens av markør genet ble observert også her.

Ved gjennomgang av eksisterende stamtorsk materialet i Parisvatnet, ble det funnet et mindre antall hunn- og hannfisk som var genetisk merket. På basis av disse ble det satt opp både pose og karforsøk for å produsere en ny generasjon genetisk merket torsk. Både pose og kar forsøk hadde rimelig høy overleving av yngel. Det har dessverre vært større dødelighet enn ventet ved de høye sommer temperaturene. Fisken blir nå merket (PIT) og prøvetaking skal gjennomføres når fisken er stor nok

Rapporter og publikasjoner

Prosjektet er startet opp i inneværende år, og det er naturlig nok ikke publiserbare resultater så tidlig i arbeidet. I tilknytning til prosjektet er det imidlertid utarbeidet ulike rapporter og foredrag hvor torsk står sentralt:

Jørstad, K.E. 2002a. Genetikk og torskeoppdrett – utfordringer og muligheter. Havbruksrapport 2002, s. 84-88.

Jørstad, K.E. 2002b. Genetic aspects with marine stock enhancement – recent results from Norwegian experiments. Norwegian – Chinese Workshop, Qingdao, China, May 2002 (invited talk).

Jørstad, K.E. 2002c. Genetic studies in marine stock enhancement in Norway. Second International Symposium on Stock Enhancement and Sea Ranching, Kobe, Japan

(accepted in Proceedings).

Glette, J., Berg, Ø., Jørstad, K.E. og Otterå, H. 2002. Miljørelaterte problemstillinger relatert til fremveksten av torskeoppdrett. Notat til Fiskeridepartementet, juni 2002.

Jørstad, K.E., Otterå, H. og Svåsand, T. 2002. Mikrosatelitt DNA identifisering av familiegrupper – eksempler fra studier på hummer og torsk (EU-prosjekter). Norges forskningsråd Programkonferanse Havbruk og Villaks, Tromsø, september 2002.

Delprosjekt140702: Torskelus

Torskelus: skaffe insikt i livssyklus og skadepotensiale for lus på torsk, da med spesiell fokus på *Caligus curtus*.

Livssyklusen til *C. curtus* er beskrevet av Heergaard 1947. Resultatene her avviker fra det som er beskrevet hos andre arter i slekten *Caligus* og gode beskrivelser/tegninger av de forskjellige stadiene mangler.

Livssyklus, resultater så langt:

Klekking av egg i stillestående vann gav et svært en svært dårlig klekking og overlevelse frem til infektivt stadium. Vi har derfor utviklet et klekkesystem med kontinuerlig flow som gir langt bedre resultater.

Vi har smittet fisk og delvis gjennomført livvsyklus ved 10°C. Fisk ble samlet hver dag, og lus ble målt og fiksert. Så langt har vi funnet 8 stadier (tabell 1). Kort tid etter skallskifte til preadult forsvant lusen fra fisken og vi fikk derfor ikke avklart med sikkerhet om det forekommer flere stadier før det adulte stadium.

En adult hunn m. eggstrenger i genitalsegmentet har vokst opp i labben, og denne hadde samme størrelse som hunner i modergenerasjonen. Størrelsen på denne tilsier at det ikke er flere stadier mellom preadult og adult, men flere observasjoner er nødvendig for å kunne si noe med sikkerhet.

Hanner er vanligvis en smule større enn hunner, men noen hannlus skiller seg ut ved å være enormt store (ikke observert i laboratoriet). Disse skiller seg såpass mye i størrelse fra de andre hannlusene at det virker sansynlig at det kan forekomme et ekstra skallskifte hos hanner (eventuelt bare hos enkelte hanner). Ulikt antall stadier for hanner og hunner er beskrevet tidligere hos medlemmer av slekten *Caligus*, og dette er et tema som skal undersøkes nærmere.

Tabell 1 *C. curtus*: størrelse og varighet av ulike stadier.

Stadium	Lengde (mm)(min-max)	Varighet (dager)
Nauplie1	*	*
Nauplie2	*	*

Copepoditt (fri)	*	*
Copepoditt (på fisk)	1,0 (0,9-1,1)	8
Chalimus1	1,4 (1,3-1,6)	5
Chalimus2	2,6 (2,2-3,0)	6
Chalimus3	4,2 (3,6-4,6)	7
Preadult	6,1 (5,6-6,4)	**
Adult	mangler data	

*) Ikke gjennomført, separat forsøk utført i stillestående vann på klimarom 10°C mislykkes.

***) Disse forsvant fra fisken kort tid etter skallskifte, kan ikke beregne varighet.

Rømningsproblemet:

Der lite lus på fisken langs vestlandet og det har vært vanskelig å skaffe tilstrekkelig materiale til forsøkene. Fisk som blir satt i merd mister raskt sine lus, og skal en få tak i de få lusene som finnes må en være med når fisken fanges. Lusen forsvinner også raskt fra fisk i kar og vi har derfor også hatt et problem med å holde lus på fisk i laboratoriet.

Hvorfor forsvinner lusen? Vi har en hypotese om at *C. curtus* flytter seg oftere mellom verter enn lakselusen. Er det stor tetthet av fisk blir den raskt spist når den befinner seg i vannet (en sil på utløpsvannet bekrefter at lusen ikke tar den veien ut av karet).

Forsøk med oppbevaring av lus på fisk i et stort kar (5x1x1 m³) med bunnen dekket av stein og blåskjell var vellykket. I et annet forsøk ble tre fisk med lus flyttet fra et kar med 10 fisk til separate kar, like før lusene nådde preadult stadium. Kort etter skallskifte forsvant lusen raskt fra karet med flere fisk, mens den ble på fisken og utviklet seg til adult stadium i en-fisk karene. Vi mener nå vi har funnet en måte å holde lusen på fisken til den når adult stadium. Stikkord er få og store fisk, samt substrat på bunn der lusen kan skjule seg når den ikke er på fisken, eller eventuelt ha en fisk i separate kar.

Det er knapt funnet hannlus blandt lusen som er dyrket fram. Blandt de preadulte er det aldri observert hanner, og kun to adulte hannlus er funnet på fisk (i basenget ute). Disse ble funnet på 2 fisk som 10 dager tidligere var rensset for lus og satt uti igjen. Dette tyder på at hannlusen har befunnet seg fritt i basenget og så hoppet på fisken igjen. Grunnen til at så få hanner er observert, er antageligvis at hanner er mer villig til å bevege seg mellom verter enn hunner.

Identifisering av stadier:

De ulike stadier har distinkte størrelsesintervaller og kan enkelt og entydig identifiseres ut fra lengde (tabell 1).

Chalimus 1-3 stadiene benytter samme filament gjennom skallskiftene. En "attachment node" limes på proximalt på filamentet for hvert skallskifte, og stadium kan identifiseres ved å telle antall noder. Chalimus 1 har 1 node, chalimus 2 har 2 noder osv.

Samme filament benyttes også ved skallskifte til preadult stadium. Lusen henger da 1-2 dager i filamentet etter skallskifte (da med 4 noder) intill skallet er herdet og ekstremitetene er harde nok til å gi feste på fisken til et liv uten filament.

Fig 1. Bildet viser copepoditt, chalimus 1-3, og en preadult m. filamentet fremdeles festet.



Videre arbeid:

- Varighet av nauplie og copepoditt stadier ved 10°C (pågår).
- Hvilken temperatur er optimal for utviklingen av *C. curtus*? Livssyklus på 5°C er snart gjennomført (dog med svært få fisk og lus). Klekkesuksess og utviklingstid vurderes.
- En nøye beskrivelse de ulike stadier skal gjennomføres (såvidt påbegynt).
- Vev fra smittet fisk er fixert og histologiske undersøkelser skal foretaes.
- Smitteforsøk med høye konsentrasjoner av lus for å vurdere skadepotensiale.

Delprosjekt 140703: Innsamling og testing av genetisk merket torsk, samt styrke stamfiskbestanden av hyse.

Bakgrunn:

Utvalg av egenprodusert stamfisk har til nå vært basert på enkle kriterier som overlevelse og vekst. Dette har sannsynligvis ført til at den egenproduserte stamfisken i dag stammer fra en liten gruppe foreldre (kun en hunn?). Et av de viktigste mål for prosjektet vil være en kartlegging av stamfisken for om mulig detektere, og dermed hindre fremtidig innavl i produksjonen.

All stamfisk vil bli genotypet for å skaffe en oversikt over tilstanden til dagens stamfisk bestand. Disse dataene vil kunne gi informasjon om mulig innavl innen den stamfisken vi i dag bruker. All fremtidig stamfisk måtte gå gjennom den samme screeningen før den kan brukes som stamfisk.

Mål:

1. Skaffe kontroll over mulig innavl innen dagens og fremtidig stamfisk for alle artene.
2. Kartlegge allerede produsert fisk med tanke på familietilhørighet.
3. Kontrollere overlevelse av avkom i forskjellige faser av produksjonen.
4. Identifisere familiegrupper i forbindelse med kvantitative karakterer.

Milepæler

2002 Kartlegge all stamfisk og avkom

Aktiviteter i 2002

I tillegg til torsk og hyse har vi også kartlagt kveitebestanden innenfor prosjektet.

For alle arter gjelder følgende:

Det ble tatt finneklipp av all tilgjengelig stamfisk. Denne ble lagt direkte på tørris, og fraktet eller sendt til Bergen, hvor den blir oppbevart ved -80 grader til DNA ekstraheres ved bruk av såkalt Quiagen kit. Alle individer er deretter analysert ved hjelp av et sett med mikrosatellitt primere, og allelene er scoret i Genotyper. Allelene er overført fra Genotyper til excel-ark hvor dataene er formatert til bruk i forskjellige statistiske analyseverktøy.

For slektskaps analyser er det benyttet et program kalt KINSHIP. Dette programmet beregner slektskapet mellom hvert enkelt individ.

Analyser av stamfisk kveite

Totalt ble det tatt prøver av 93 stamfisk. 86 er analysert for variasjon i 10 forskjellige loci. De resterende vil bli analysert i løpet av januar.

Resultatene viser at det dessverre er en god del fisk som sannsynligvis stammer fra samme foreldre par i tidligere produksjon, og at disse ikke må krysses med hverandre i fremtidig produksjon.

Det er i ferd med å bli produsert et "Krysningsskjema" som kan brukes for å unngå å sette opp krysninger mellom stamfisk som er nært beslektet.

Analyser av stamfisk torsk

Totalt ble det tatt prøver av 80 stamfisk. Alle er analysert for variasjon i 4 forskjellige loci.

Analyser av stamfisk hyse

Totalt ble det tatt prøver av 12 stamfisk. Denne bestanden er senere supplert med flere stamfisk, men disse er ikke med i denne første analysen. Alle individene er analysert for variasjon i 4 forskjellige loci.

Måloppnåelse i forhold til søknad

Vi har genotypet all tilgjengelig stamfisk, men det har ikke blitt gjort noen genotyping av avkom i år. Dette skyldes delvis at vi har hatt mange og uforutsette problemer med sekvenseringsmaskinen, som igjen har ført til at antall analyser totalt i år ikke har vært som forventet. Dette er imidlertid rettet og vi kjører nå optimalt.

Vi har konstatert at det er stor genetisk likhet (slektskap) mellom individene i stamfiskbesetningen av kveite, og dette må det taes hensyn til ved stryking i 2003.

Prosjektet har tydeligvis gitt oss et forsprang nr det gjelder denne typen analyser av marine arter i oppdrett, ettersom det har kommet inn to uavhengige henvendelser fra private firma om å gjøre genotyping av stamfisken deres.

Delprosjekt 140704, 2002: Reproduksjon kveite

Klargjøre prinsipper for vellykket eggproduksjon hos kveite med fokus på familievariasjon (genetiske, maternale og paternale effekter) og forskjøvet gyttetidspunkt. DNA- fingerprinting vil bli brukt for å studere relativ overlevelse av egg fra ulike hunnfisk, eller egg fra samme porsjon, men befruktet med sperm fra ulike hannfisk.

For domestisering av nye oppdrettsarter er god kjennskap til artenes reproduksjonsbiologi og -fysiologi avgjørende, for å sikre stabil produksjon av gameter. Torsk, hyse og kveite byr alle på forskjellige utfordringer når det gjelder reproduksjon. Kveite er den av de tre som kanskje har vært mest problematisk så langt, og variabel eggkvalitet og eggproduksjon er et stort, og voksende, problem for kveitenæringen. Med dagens problematiske stamfisksituasjon er det svært vanskelig å skille maternale effekter på utvikling og overlevelse fra genetiske og miljømessige. For å løse problemet må en legge innsatser på flere forskningsområder – både stamfiskernæring, fysiologi og atferd er viktige felt hvor økt kunnskap vil bidra til en mer stabil reproduksjon. Kveitenæringen baserer seg i dag på stryking av stamfisk, og for å få best mulig kvalitet på

eggene er tett oppfølging av hunfisken i forhold til individuell ovulasjonsrytme nødvendig. Selv om systemer for naturlig gyting i kveite er ønskelige på sikt, vil et faglig forsvarlig oppsett være svært kostbart og kreve store ressurser både i form av karinstallasjoner, fisk og ikke minst spesialkompetanse innenfor skjæringsfeltet mellom atferd, fysiologi og endokrinologi. Naturlig gyting har vært observert ved noen anlegg, men arbeidet som er gjort har vært usystematisk og forståelsen for de bakomliggende regulerende mekanismer og stimuli er fortsatt liten. Egg fra naturlig gytende kveite har dessuten vist seg mer utsatt for bakterieinfeksjoner enn strøkne egg. Det mangler imidlertid fortsatt gode metoder for å evaluere modningsstatus og gametkvalitet. De metoder som blir brukt i dag er ikke tilstrekkelig nøyaktige og det er stort behov for å forbedre disse.

Rundt tiden for ovulasjon er et antal faktorer identifiserte i ovariene hos fisk (Berndtson and Goetz, 1988; 1990, Bobe and Goetz, 2000a; 2000b, Cetta and Goetz, 1982, Coffman and Goetz 1998; Coffman et al, 2000, Garzcynski and Goetz, 1997, Hajnik et al, 1998) . Blant disse finner vi m. a. proteiner som er aktive ved syntese av steroidhormon (for eksempel StAR, steroidigenic acute regulatory protein), for å gjøre eggene befruktningsdyktige og proteiner som sansynligvis har en rolle ved overmodning og resorpsjon av egg (for eksempel en tumørnekrose-faktor). Ved å studere opp- respektive nedregulering av disse faktorene vil vi kunne få et bilde av den molekylære reguleringen av ovulasjon og overmodning.

Følgende forskningsaktiviteter er er tenkt gjennomført i prosjektperioden:

1. For å kunne studere ekspresjon av flere faktorer samtidig, og samspillet mellom disse, er det planlagt å utvikle microarrays for ulike stadier. I et microarray-system blir cDNA-prober laget og plassert på en mikrochip som blir analysert. En slik chip kan teoretisk få plass til tusenvis av cDNA-prober og gir altså mulighet for å studere ekspresjon av mange gener samtidig i en liten prøve. Vanligvis vil en lage chips med mellom 10 og 100 prober, noe som fortsatt gir mulighet å studere samspill mellom mange interessante faktorer. For å gjøre dette er det først nødvendig med identifisering via kloning og sekvensering av genene for de ulike stadie-spesifikke faktorene. Ved å ta i bruk stadie-spesifikke cDNA-bibliotek og subtraktiv hybridisering (Diatchenko et al, 1996) er dette arbeide påbegynt og StAR er blitt klonet fra torskeovarier. Arbeidet vil videreføres på kveite.

2. Effekt av stryketidspunkt og lagring av egg på befruktning. Ovulerte egg vil bli holdt i definerte inkubasjonsløsninger og befruktning registrert ved bestemte tidsintervall. Effekt av stryketidspunkt i forhold til ovulasjon vil bli undersøkt, liksom effekter av proteaser, proteaseinhibitorer og andre faktorer som kan påvirke eggens fertilitet. Ovarievæskens sammensetning vil bli analysert ved ulike stryketidspunkter.

3. Studier av maternale/paternale effekter på viabilitet og utvikling hos kveitelarver. DNA-fingerprinting vil bli brukt for å studere relativ overlevelse av egg fra ulik hunfisk, eller egg fra samme porsjon men befruktet med sperm fra ulik hanfisk, og inkubert i det samme systemet. Mikrosatellitter vil bli mangfoldiget fra meget små vevsfragment ved hjelp av PCR. De resulterende fragmenter vil bli separert, størrelsesbestemt og alleler scoret med automatisk sekvenseringsmaskin. Det er utviklet minst 10 primerere for kveite, med mellom 2 og 22 alleler. Det store antallet alleler gjør at det kan være mulig å sikkert identifisere avkom fra minst 50-60 ulike familier, basert på 3-4 ulike set med primere.

Relativ overlevelse vil bli sammenlignet med befruktningsprosent og andre relevante eggkvalitetskriterier. Spermkvalitet kan karakteriseres ved databasert spermanalyse (CASA).

4. For å teste eggkvalitet fra ulike foreldrefisker, vil 48 egg fra hver porsjon bli inkubert i NUNC-brett. Eggene vil bli kontrollert hver dag og dødelighet, klekkesuksess, klekkeforløp, overlevelse på dag 1 etter klekking samt antall normalt utviklede larver vil bli registrert. Dette er det basale målet på eggkvalitet. I en videreføring kan grupper av larver bli testet i atferdsobservasjonssystemet på Austevoll.

Referanser

- Berndtson, A. and F.W. Goetz. (1988). Protease activity in brook trout (*Salvelinus fontinalis*) follicle walls demonstrated by substrate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Bio. Reprod.* 38, 511-516.
- Berndtson, A.K., F.W. Goetz. (1990). Metallo-protease activity increases prior to ovulation in brook trout (*Salvelinus fontinalis*) and yellow perch (*Perca flavescens*) follicle walls. *Biology of Reproduction* 42, 391-398.
- Bobe, J.S. and F.W. Goetz (2000a). A tumor necrosis factor decoy receptor homologue is up-regulated in the brook trout (*Salvelinus fontinalis*) ovary at the completion of ovulation. *Biology of Reproduction* 62: 420-426.
- Bobe, J. and F.W. Goetz. (2000b). A S100 homologue mRNA isolated by differential display PCR is down regulated in the brook trout (*Salvelinus fontinalis*) postovulatory ovary. *Gene* (in review).
- Cetta, F. and F.W. Goetz. (1982). Ovarian and plasma prostaglandin E and F levels in brook trout (*Salvelinus fontinalis*) during pituitary-induced ovulation. *Biol. Reprod.* 27, 1216-1221.
- Coffman, M.A. and F.W. Goetz (1998). Trout ovulatory proteins are partially responsible for the anti-proteolytic activity found in trout ovarian fluid. *Biology of Reproduction* 59; 497-502.
- Coffman, M., J.H. Pinter and F.W. Goetz (2000). Trout ovulatory proteins: Site of synthesis, regulation and possible biological function. *Biology of Reproduction* 62:928-938.
- Diatchenko, L., Lau, Y.-F., Campbell, A.P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E.D. and Siebert, P.D. (1996). Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:6026-6030.
- Garczynski, M. and F.W. Goetz (1997). Molecular characterization of a ribonucleic acid transcript that is highly upregulated at the time of ovulation in the brook trout (*Salvelinus fontinalis*) ovary. *Biology of Reproduction* 57, 856-864.
- Hajnik, C., F.W. Goetz, S-Y. Hsu and N. Sokal (1998). Characterization of a ribonucleic acid transcript from the brook trout (*Salvelinus fontinalis*) ovary with structural similarities to mammalian adipsin/complement factor D and tissue kallikrein, and the effects of kallikrein-like serine proteases on follicle contraction. *Biology of Reproduction* 58; 887-897.