

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2009.00495

黄牛、牦牛和犏牛睾丸组织中 *Cdc2*、*Cdc25A* 基因 mRNA 表达水平

董丽艳, 李齐发, 屈旭光, 李隐侠, 李新福, 徐洪涛, 谢庄

南京农业大学动物科技学院动物生殖遗传与分子进化实验室, 南京 210095

摘要: 黄牛和牦牛远缘杂交后代犏牛雄性不育是牦牛杂交改良中的一大难题。*Cdc2* 和 *Cdc25A* 是减数分裂的两个关键基因, 其表达水平的下降将使精子发生不能正常进行, 导致雄性不育。为了探讨 *Cdc2*、*Cdc25A* 基因 mRNA 表达水平与犏牛雄性不育的关系, 文章采用荧光定量 PCR 技术对 *Cdc2* 和 *Cdc25A* 基因的组织表达特征以及在黄牛、牦牛和犏牛睾丸组织中的表达水平进行了分析。结果表明: *Cdc2* 和 *Cdc25A* 基因在牦牛各种组织中广泛表达, 说明 *Cdc2* 和 *Cdc25A* 基因在各种组织细胞分裂和细胞周期运行中均发挥作用; 黄牛和牦牛睾丸组织中 *Cdc2*、*Cdc25A* 基因表达水平均显著高于犏牛 ($P<0.05$), 说明睾丸组织中 *Cdc2* 和 *Cdc25A* 基因的低表达可能与犏牛雄性不育相关。

关键词: *Cdc2*; *Cdc25A*; 犏牛; 雄性不育

Expression levels of *Cdc2* and *Cdc25A* mRNA in cattle, yak, and cattle-yak testis

DONG Li-Yan, LI Qi-Fa, QU Xu-Guang, LI Yin-Xia, LI Xin-Fu, XU Hong-Tao, XIE Zhuang

Laboratory of Animal Reproductive Genetics and Molecular Evolution, College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

Abstract: The infertility of cattle-yak, which is the hybrid offspring of cattle and yak, is a difficult problem in cross-breeding and improvement of yak. *Cdc2* and *Cdc25A* are the key genes of meiosis. The decline of their expression levels will cause the spermatogenesis failure and lead to infertility. Therefore, this study was conducted to study the relationship between the infertility of cattle-yak and the expression levels of *Cdc2*/*Cdc25A* genes. The expression profiles were obtained by RT-PCR. *Cdc2* and *Cdc25A* genes were widely expressed in many tissues, which confirmed their important role in cell division and the progression of cell cycle. Real-time quantitative PCR analysis indicated that the expression levels of *Cdc2* and *Cdc25A* in cattle and yak testis were higher than those in cattle-yak ($P<0.05$). Therefore, low expression levels of *Cdc2* and *Cdc25A* genes may have a relationship with the infertility of cattle-yak.

Keywords: *Cdc2*; *Cdc25A*; cattle-yak; infertility

犏牛是牦牛和普通牛的一代杂种, 其生产性能明显优于牦牛, 但由于种间杂种雄性不育, 使其在

收稿日期: 2008-09-22; 修回日期: 2008-12-13

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 30500360)和南京农业大学青年科技创新基金项目(编号: KJ05011)资助

作者简介: 董丽艳(1983-), 女, 在读硕士, 专业方向: 动物分子数量遗传学。E-mail: dongliyan2008@126.com

通讯作者: 李齐发(1975-), 男, 副教授, 研究方向: 动物生殖遗传与分子进化。E-mail: liqifa@njau.edu.cn

谢庄(1947-), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 动物分子数量遗传学。E-mail: zxie@njau.edu.cn

生产和育种中的应用均受到极大的限制^[1]。国内外学者对牦牛远缘杂交后代雄性不育机理从杂交组合、组织形态、生殖内分泌、细胞遗传学以及蛋白多态等多方面进行了大量研究,但目前尚未得到能证实的理论依据^[2],因此探明牦牛雄性不育机制成为近年来牦牛杂交改良和育种有待解决的难题。

*Boule*基因是近年来新发现的控制精子发生过程中减数分裂的主要调控基因,是*DAZ*基因家族的新成员,*Boule*的缺乏会引起减数分裂障碍、精子发生失败,导致雄性不育^[3]。人类和果蝇的*Boule*基因都是通过一个相同的信号途径来调控精母细胞减数分裂过程,即*Boule*基因第一次减数分裂的前期表达,促进*Cdc25A* (Cell division cycle 25A)基因mRNA的翻译,*Cdc25A*蛋白促使*Cdc2*去磷酸化,从而激活*Cdc2/cyclinB*复合物MPF(M-phase promoting factor),而活化的MPF启动减数分裂过程G2/M的转换,完成减数分裂过程^[4-6]。作为*Boule*基因的下游信号分子,*Cdc2*和*Cdc25A*在睾丸组织中的高表达对精子发生至关重要,在人和小鼠的睾丸中,*Cdc2*、*Cdc25A*基因表达下降将引起生精障碍,导致不育^[3,7]。

张庆波^[8]研究发现牦牛睾丸组织中*Boule*基因的表达缺乏或显著下降,*Boule*是牦牛雄性不育的候选基因。为了研究*Boule*基因的作用机制和其下游信号分子与牦牛雄性不育的关系,本文采用荧光定量PCR技术对*Cdc2*和*Cdc25A*基因的组织表达特征以及在黄牛、牦牛和牦牛睾丸组织中的表达水平进行分析。

1 材料和方法

1.1 实验动物

选取同一生态地区四川松潘、茂县自然放牧的3岁左右的健康的公黄牛、公牦牛和公犏牛各8头,共24头,屠宰后采取睾丸、附睾、副性腺、垂体、下丘脑、心脏、肝脏、脾脏、肾脏、肺脏、胸肌等组织样,迅速置于液氮中保存。

1.2 方法

1.2.1 引物设计与合成

以看家基因 β -actin为内参,从GenBank检索牛*Cdc2*(GenBank登录号:NC007329)、*Cdc25A*(GenBank登录号:BC151493)和 β -actin(GenBank登录号:NM173979)mRNA序列,综合考虑引物设计的各项原则,在Primer Premier 5.0软件中设计引物。引物序列分别为

Cdc2: F: 5' TC TATCCCTCCTGGTCAGTTC-3', R: 5' -TGTCCACTGGAGTTGAGTAGC-3' (产物长度: 283 bp); *Cdc25A*: F: 5' -ACCTCTTTCATACCGTTGCTG G-3', R: 5' -AACTC CTTGTATCCGCCCTTCA-3' (产物长度: 385 bp); β -actin: F: 5' -TCCAGCCTTC CTTCCTGGGCAT-3', R: 5' -GGACAGCACCGTGTT GGCGTAGA-3' (产物长度: 116 bp)。引物由宝生物工程(大连)有限公司合成。

1.2.2 RNA提取与反转录

采用Trizol法提取牛各种组织的总RNA,紫外分光光度计测定总RNA浓度和纯度($OD_{260}/OD_{280}=1.8\sim 2.0$)。总RNA反转录的反应体系为25 μ L: 包括2 μ g总RNA, 200 U M-MLV反转录酶(Promega公司), 1 μ g oligo(dT)₁₈引物, 20 U Rnasin inhibitor, 0.4 mmol/L dNTP, 5 μ L 5 \times RT Buffer。将RNA模板、oligo(dT)₁₈引物和dNTP混合, 70 $^{\circ}$ C变性5 min, 迅速放冰上冷却, 加入其余试剂并混匀, 37 $^{\circ}$ C 1 h, 95 $^{\circ}$ C 5 min。反转录产物于-20 $^{\circ}$ C保存。

1.2.3 PCR扩增、克隆测序及Real-time PCR反应

PCR扩增体系为10 μ L: 包括1 μ L PCR buffer, 0.5 μ L dNTPs, 0.5 μ L MgCl₂, 0.5 μ L上游和下游引物, 0.5 μ L RT产物, 0.1 μ L Taq DNA聚合酶(TaKaRa公司)。扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 3 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 复性30 s(复性温度分别为*Cdc2*基因56.8 $^{\circ}$ C, *Cdc25A*基因60.8 $^{\circ}$ C, β -actin基因56.8 $^{\circ}$ C), 72 $^{\circ}$ C 30 s, 35个循环, 72 $^{\circ}$ C 5 min。PCR产物经琼脂糖凝胶电泳分离, 用V-gene DNA凝胶回收试剂盒(V-gene公司)纯化(按说明书操作)。回收的DNA片段与pMD18-T Simple vector载体连接并转化JM109菌株。挑取阳性克隆, 用V-gene质粒DNA提取试剂盒(V-gene公司)提取质粒, PCR鉴定后送上海英骏生物技术有限公司测序。

RT-PCR方法检测*Cdc2*基因和*Cdc25A*基因在牦牛各组织中的表达, PCR产物用8%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 银染, 拍照。

mRNA表达水平利用实时荧光定量仪(美国MJ公司)来评估。反应体系为20 μ L: 包括1 μ L RT产物, 10 μ L SYBR Premix Ex TaqTM荧光定量酶, 0.5 μ mol/L目的基因上游和下游引物各0.4 μ L, 无菌双蒸水8.2 μ L。反应条件: 95 $^{\circ}$ C预变性1 min; 95 $^{\circ}$ C 10 s, 复性10 s(复性温度分别为*Cdc2*基因56.8 $^{\circ}$ C, *Cdc25A*基因60.8 $^{\circ}$ C, β -actin基因56.8 $^{\circ}$ C), 72 $^{\circ}$ C 15 s, 45个循

环, 72 实时检测荧光信号; 65~94 , 每隔 0.2 读板一次, 检测熔解曲线。以 β -actin 为内参, 每个样品 3 个重复, 用克隆有目的片段的质粒梯度稀释后作为标准品, 制作标准曲线。

1.2.4 数据分析

定量结果用 SPSS13.0 软件进行统计分析, 采用 One-Way ANOVA 分析。

构建数学模型: $y_{ij} = \mu + B_i + e_{ij}$ 。其中, y_{ij} 为第 i 个牛种类第 j 头牛的观测值; μ 为总体效应值; B_i 为第 i 个牛种类效应值($i=1, 2, 3$, 分别表示黄牛、牦牛、犏牛); e_{ij} 为残差, $e_{ij} \sim N(0, \sigma^2)$ 。

2 结果与分析

2.1 黄牛、牦牛、犏牛 *Cdc2* 基因、*Cdc25A* 基因和 β -actin 基因 RT-PCR 扩增结果

如图 1 所示, 在黄牛、牦牛、犏牛睾丸组织中, *Cdc2*、*Cdc25A* 和 β -actin 基因引物的 RT-PCR 扩增特异性条带分别为 283 bp、385 bp 和 116 bp, 与预期结果一致。将 *Cdc2*、*Cdc25A* 和 β -actin 基因的扩增片段克隆于 pMD18-T Vector 中, 用 DNASTar 对测序结果与引物设计源序列进行同源性比较, 结果显示各基因与引物设计源序列同源性达 100%, 表明 PCR 扩增片段为黄牛、牦牛和犏牛特异的 *Cdc2*、*Cdc25A* 和 β -actin 基因 cDNA 片段。

2.2 牦牛 *Cdc2* 基因、*Cdc25A* 基因的组织表达谱分析

分别利用 *Cdc2* 基因、*Cdc25A* 基因引物对牦牛睾丸、附睾、副性腺、下丘脑、垂体、心脏、肝脏、脾脏、肾脏、肺脏、胸肌组织进行 RT-PCR 扩增, 结果(图 2)表明: *Cdc2* 和 *Cdc25A* 基因在各种组织中都有表达。

2.3 黄牛、牦牛和犏牛睾丸组织 *Cdc2* 基因、*Cdc25A* 基因 mRNA 荧光定量分析

用 Real-time PCR 法对 3 种牛睾丸组织 *Cdc2*、

Cdc25A 基因表达量进行分析, 结果显示(表 1 和图 3), 黄牛睾丸组织 *Cdc2* 基因 mRNA 表达量 (11.5260 ± 2.17404)、牦牛睾丸组织 *Cdc2* 基因 mRNA 表达量 (12.0780 ± 2.07090), 均显著高于犏牛睾丸组织 *Cdc2* 基因 mRNA 表达量 (5.9198 ± 0.89957) ($P < 0.05$); 黄牛睾丸组织 *Cdc25A* 基因 mRNA 表达量 (1.8349 ± 0.50976)、牦牛睾丸组织 *Cdc25A* 基因 mRNA 表达量 (2.0718 ± 0.31021) 均显著高于犏牛睾丸组织 *Cdc25A* 基因 mRNA 表达量 (0.8213 ± 0.08738) ($P < 0.05$)。

3 讨论

组织形态学观察发现犏牛生精小管上皮多由 1~2 层精原细胞构成, 初级精母细胞很少, 无次级精母细胞, 附睾内未观测到精子, 而黄牛、牦牛睾丸组织中可见各级生精细胞, 附睾内可见发育良好的精子^[1,2], 可见 F_1 代犏牛雄性不育主要是由精子发生过程中减数分裂障碍所引起的。哺乳动物精母细胞减数分裂是精子发生过程中的关键步骤, 参与减数分裂调控的基因发生缺失或突变容易引起无精子症和男性不育, 其中 *DAZ* (Deleted in Azoospermia) 家族 (*DAZ* family) 就是其中非常重要的一类^[9~14], 而 *Cdc25A* 是 *DAZ* 基因家族的下流底物^[15], 在细胞周期中, 它对 M 期的调控有重要作用^[15], *Cdc25A* 表达量减少将降低 MPF 的活性, 进一步抑制细胞进入细胞周期, 导致细胞凋亡^[16]。

真核生物的减数分裂是由 MPF 启动的, MPF 是由调节亚基 Cyclin B 和催化亚基 *Cdc2* 所组成, 它的活化受 *Cdc2* 的 15 位酪氨酸和 14 位苏氨酸的去磷酸化所控制。*Boule* 基因在第一次减数分裂的前期表达, 当进入 M 期, *Boule* 促进 *Cdc25A* 磷酸酶基因 mRNA 的翻译, 然后 *Cdc25A* 蛋白促使 *Cdc2* 去磷酸化, 从而激活 MPF 的活性, 即 *Boule* 通过调节 *Cdc25A* 来调控 MPF。被激活的 MPF 使细胞磷酸化, 引起核膜

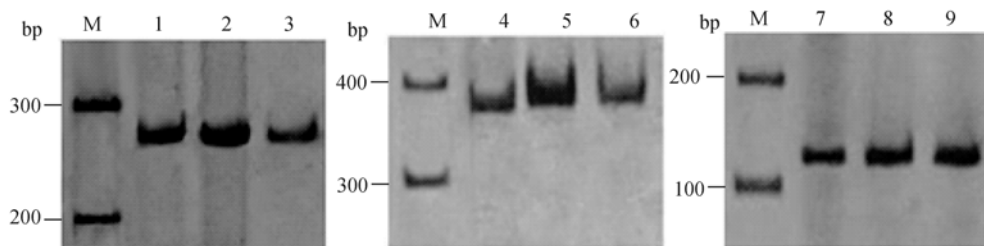


图 1 黄牛、牦牛和犏牛 *Cdc2* 基因、*Cdc25A* 基因和 β -actin 基因的 RT-PCR 电泳图

M: DNA 分子量标记(100 bp ladder); 1~3: 分别为黄牛、牦牛、犏牛 *Cdc2* 基因扩增片段; 4~6: 分别为黄牛、牦牛、犏牛 *Cdc25A* 基因扩增片段; 7~9: 分别为黄牛、牦牛、犏牛 β -actin 扩增片段。

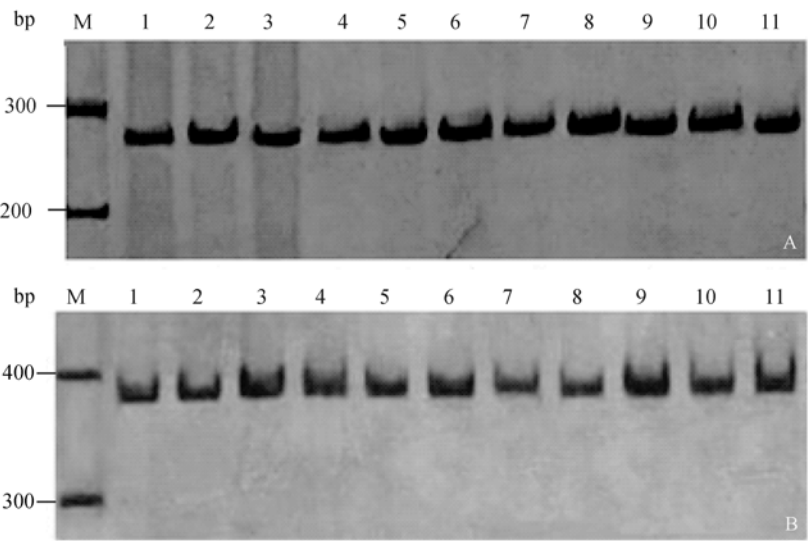


图 2 牦牛 *Cdc2*、*Cdc25A* 基因在各组织中的表达
A: 为 *Cdc2* 基因; B: 为 *Cdc25A* 基因。M: DNA 分子量标记(100 bp ladder); 1: 睾丸; 2: 附睾; 3: 副性腺; 4: 垂体; 5: 下丘脑; 6: 心脏; 7: 肝脏; 8: 脾脏; 9: 肾脏; 10: 肺脏; 11: 胸肌。

表 1 黄牛、牦牛和犏牛睾丸组织中 *Cdc2*、*Cdc25A* 基因 mRNA 的表达水平的方差分析

变异来源	<i>Cdc2</i>				<i>Cdc25A</i>			
	平方和(SS)	自由度(df)	均方(MS)	F 值	平方和(SS)	自由度(df)	均方(MS)	F 值
种类间	185.755	2	92.878	3.545 [*]	7.060	2	3.530	3.639 *
种类内(误差)	550.160	21	26.198		20.368	21	0.970	
总变异	735.915	23			27.428	23		

注: *表示差异显著。

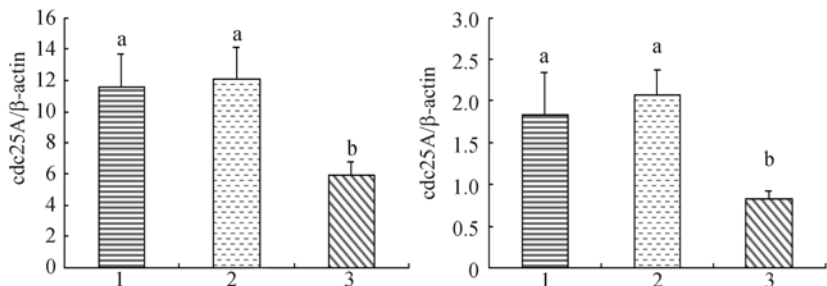


图 3 黄牛、牦牛和犏牛睾丸组织中 *Cdc2*、*Cdc25A* 基因 mRNA 的表达水平
1: 黄牛 2: 牦牛 3: 犏牛; 不同字母表示黄牛和犏牛, 牦牛和犏牛 *Cdc2*、*Cdc25A* 表达量差异显著($P<0.05$)。

破裂, 染色体浓缩, 形成纺锤体, 这样来控制减数分裂。研究发现在精子发生异常患者中*BOULE*基因表达缺乏或减少, 引起减数分裂阻滞和精子生成障碍, 精子发生停留在初级精母细胞阶段^[17], 从而导致无精子症或少精子症并产生不育^[18]。在小鼠中的精原细胞、初级、次级精母细胞中, *Cdc25A*高表达, 说明*Cdc25A*在减数分裂中起着重要作用^[19,20]。*Cdc25A*蛋白主要在精母细胞、精细胞以及精子中表达。在精子发生失败患者中, 尤其是减数分裂受阻和唯支持细胞综合征患者中, *Cdc25A* mRNA表达水平显著降低^[16], 因此推断精子发生失败与*Cdc25A*

表达水平降低有关。*Cdc2* 作为MPF的组成部分, 在精子发生过程中起着至关重要的作用^[21], *Cdc2* 被破坏将导致减数分裂受阻, 从而不能形成正常的生殖细胞^[22, 23]。Lin等^[3]利用实时定量PCR技术检测 37 个少精症患者睾丸*Cdc2*、*Cdc25A*表达水平。在精子发生失败患者中, *Cdc2*、*Cdc25A*表达水平明显下降。表明其表达水平与精子发生障碍相关。

本文研究发现*Cdc2* 和*Cdc25A*基因在牦牛各种组织中都有表达(图 2), 与其他物种的研究结果是一致的^[24], 这与其广泛的生理功能是相符的, 即*Cdc2* 和*Cdc25A*是细胞周期进行与细胞增生的调控者^[15]。

[16, 19, 20, 22, 23](#)。本文通过荧光实时定量PCR在黄牛、牦牛和犏牛睾丸组织中对*Cdc2*和*Cdc25A*基因表达量进行了分析(图3和表1), 分析发现*Cdc2*、*Cdc25A*基因在黄牛、牦牛睾丸组织中表达量高, 而在犏牛睾丸组织中表达量很低, 这与Lin等^[3]、Cheng等^[16]在男性不育患者中的研究结果一致, 说明*Cdc2*、*Cdc25A*基因的表达量可能与犏牛雄性不育有关。

参考文献(References):

- [1] 屈旭光, 李齐发, 刘振山, 董丽艳, 李新福, 郝称莉, 谢庄. 牦牛、犏牛睾丸组织中SYCP3基因mRNA表达水平研究. 畜牧兽医学报, 2008, 39(8): 112–117.
- [2] 张庆波, 李齐发, 李家璜, 李新福, 刘振山, 潘增祥, 宋大伟, 谢庄. 牛精子发生相关新基因b-DAZL的克隆、生物信息学分析与组织表达研究. 自然科学进展, 2008, 5(18): 493–504.
- [3] Lin YM, Teng YN, Chung CL, Tsai WC, Lin YH, Lin JS, Kuo PL. Messenger RNA transcripts of M-phase promoting factor and its regulators in the testes of infertile men. *Hum Reprod*, 2006, 21(1): 138–144. [\[DOI\]](#)
- [4] Xu EY, Lee DF, Klebes A, Turek PJ, Kornberg TB, Reijo RA. Human BOULE gene rescues meiotic defects in infertile male. *Hum Mol Genet*, 2003, 12(2): 169–175. [\[DOI\]](#)
- [5] Maines JZ, Wasserman SA. Post-transcriptional regulation of the meiotic Cdc25 protein by the Dazl orthologue Boule. *Nat Cell Biol*, 1999, 1(3): 171–174. [\[DOI\]](#)
- [6] 李齐发, 李隐侠, 张庆波, 刘振山, 屈旭光, 谢庄. DAZ家族新成员BOULE蛋白的结构与功能. 中国生物化学与分子生物学报, 2007, 23(10): 823–828.
- [7] Wickramasinghe D, Becker S, Ernst MK, Resnick JL, Centanni JM, Tessarollo L. Two *Cdc25* homologues are differentially expressed during mouse development. *Development*, 1995, 121(7): 2047–2056.
- [8] 张庆波. 牛精子发生相关新基因家族-DAZ基因家族的克隆、序列分析与功能研究[学位论文]. 南京农业大学, 2007.
- [9] Lin YM, Lin YH, Teng YN, Hsu CC, Shinn-Nan Lin J, Kuo PL. Gene-based screening for Y chromosome deletions in Taiwanese men presenting with spermatogenic failure. *Fertil Steril*, 2002, 77(5): 897–903. [\[DOI\]](#)
- [10] Silber SJ, Alagappan R, Brown LG, Page DC. Y chromosome deletions in azoospermic and severely oligozoospermic men undergoing intracytoplasmic sperm injection after testicular sperm extraction. *Hum Reprod*, 1998, 13(12): 3332–3337. [\[DOI\]](#)
- [11] Ferlin A, Moro E, Garolla A, Foresta C. Human male infertility and Y chromosome deletions: role of the AZF-candidate genes DAZ, RBM and DFFRY. *Hum Reprod*, 1999, 14(7): 1710–1716. [\[DOI\]](#)
- [12] Teng YN, Lin YM, Lin YH, Tsao SY, Hsu CC, Lin SJ, Tsai WC, Kuo PL. Association of a single-nucleotide polymorphism of the deleted-in-azoospermia-like gene with susceptibility to spermatogenic failure. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, 87(11): 5258–5264. [\[DOI\]](#)
- [13] Luetjens CM, Xu EY, Reijo RA, Kamischke A, Nieschlag E, Gromoll J. Association of meiotic arrest with lack of BOULE protein expression in infertile men. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004, 89(4): 1926–1933. [\[DOI\]](#)
- [14] Kuo PL, Wang ST, Lin YM, Lin YH, Teng YN, Hsu CC. Expression profiles of the DAZ gene family in human testis with and without spermatogenic failure. *Fertil Steril*, 2004, 81(4): 1034–1040. [\[DOI\]](#)
- [15] Jiao X, Trifillis P, Kiledjian M. Identification of target messenger RNA substrates for the murine deleted in azoospermia-like RNA-binding protein. *Biol Reprod*, 2002, 66(2): 475–485. [\[DOI\]](#)
- [16] Cheng YS, Kuo PL, Teng YN, Kuo TY, Chung CL, Lin YH, Liao RW, Lin JS, Lin YM. Association of spermatogenic failure with decreased CDC25A expression in infertile men. *Human Reprod*, 2006, (21): 2346–2352
- [17] Truong BN, Moses EK, Armes JE, Venter DJ, Baker HWG. Searching for candidate genes for male infertility. *Asian J Androl*, 2003, 5(2): 137–147.
- [18] Lin YM, Kuo PL, Lin YH, Teng YN, Nan Lin JS. Messenger RNA transcripts of the meiotic regulator BOULE in the testis of azoospermic men and their application in predicting the success of sperm retrieval. *Hum Reprod*, 2005, 20(3): 782–788. [\[DOI\]](#)
- [19] Wickramasinghe D, Becker S, Ernst MK, Resnick JL, Centanni JM, Tessarollo L, Tessarollo L, Grabel LB, Donovan PJ. (List all authors) Two *Cdc25* homologues are differentially expressed during mouse development. *Development*, 1995, 121(7): 2047–2056.
- [20] Wu S, Wolgemuth DJ. The distinct and developmentally regulated patterns of expression of members of the mouse *Cdc25* gene family suggest differential functions during gametogenesis. *Dev Biol*, 1995, 170(1): 195–206. [\[DOI\]](#)
- [21] Zhu D, Dix DJ, Eddy EM. HSP70-2 is required for *Cdc2* kinase activity in meiosis I of mouse spermatocytes. *Development*, 1997, 124(15): 3007–3014.
- [22] Ongkeko W, Ferguson JP, Harris AL, Norbury C. Inactivation of *Cdc2* increases the level of apoptosis induced by DNA damage. *J Cell Sci*, 1995, 108(8): 2897–2904.
- [23] Dix DJ, Allen JW, Collins BW, Allen PP, Mori C, Blizard DR. HSP70-2 is required for desynapsis of synaptonemal complexes during meiotic prophase in juvenile and adult mouse spermatocytes. *Development*, 1997, 124(22): 4595–4603.
- [24] Qiu GF, Ramachandra RK, Rexroad CE III, Yao JB. Molecular characterization and expression profiles of cyclin B1, B2, and *Cdc2* kinase during oogenesis and spermatogenesis in rainbow trout. *Anim Reprod Sci*, 2008, 105(3–4): 209–225. [\[DOI\]](#)