

暗纹东方鲀 MyoD 基因的克隆及生物信息学分析

祁艳凤, 尚凤芹, 余云登, 周金旭, 王宁, 王秀利* (大连海洋大学水产与生命学院, 辽宁大连 116023)

摘要 提取暗纹东方鲀肌肉的总 RNA, 采用 RT-PCR 的方法来克隆暗纹东方鲀 MyoD 基因的 cDNA 序列, 并通过生物信息学分析, 对该基因所编码蛋白的理化性质、亲疏水性、亚细胞定位以及蛋白质结构等进行初步的分析和预测。结果显示, 该基因编码区全长为 846 bp, 共编码了 281 个氨基酸, 编码蛋白为亲水性非跨膜类蛋白, 无信号肽结构, 其亚细胞定位于细胞核中。系统进化树分析结果表明其与红鳍东方鲀同源性最高, 亲缘关系最近。

关键词 暗纹东方鲀; MyoD 基因; 基因克隆; 生物信息学

中图分类号 S917.4 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2021)08-0089-05

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2021.08.024



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Cloning and Bioinformatics Analysis of MyoD Gene of *Takifugu obscurus*

QI Yan-feng, SHANG Feng-qin, YU Yun-deng et al (College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian, Liaoning 116023)

Abstract The total RNA of *Takifugu obscurus* muscle was extracted, and the cDNA sequence of MyoD gene of *Takifugu obscurus* was cloned by RT-PCR method. And through bioinformatics analysis, preliminary analysis and prediction of the physicochemical properties, hydrophilicity and hydrophobicity, subcellular localization and protein structure of the protein encoded by the gene were carried out. The results showed that the full length of the coding region of the gene was 846 bp, which encoded a total of 281 amino acids. The encoded protein was a hydrophilic non-transmembrane protein with no signal peptide structure, and its subcellular location was in the nucleus. The results of phylogenetic tree analysis showed that it had the highest homology with the redfin puffer and the closest genetic relationship.

Key words *Takifugu obscurus*; MyoD gene; Gene cloning; Bioinformatics

生肌调节因子 MRFs 家族包括 MyoD、MyoG、Myf5 和 Myf6 这 4 种调节因子, 该家族在成肌细胞的发育和分化方面都起着绝对作用^[1-6]。MyoD 基因作为生肌调节因子家族中的重要一员, 主要负责调控脊椎动物胚胎期的肌肉发育, 促进骨骼肌的形成与分化, 并可以通过多种途径来达到激活肌肉转录的目的, 从而促进成肌细胞的分化; 如果 MyoD 基因缺失, 可导致成肌细胞无法进行增殖和分化, 从而影响个体正常的生长和发育^[7-13]。暗纹东方鲀的可食用部位主要是肌肉, 而 MyoD 基因对肌肉生长的调控作用是至关重要的, 所以对暗纹东方鲀 MyoD 基因的研究对改良其肉质有重要意义。

暗纹东方鲀(*Takifugu obscurus*) 别称横纹多纪鲀, 属于鲀形目、鲀科、东方鲀属。暗纹东方鲀属于暖温性底层洄游性鱼类, 生活于近海地带, 在我国主要分布于黄海、东海、长江中下游区域。春季亲鱼溯河生殖洄游进入淡水江河直流进行繁殖, 幼鱼在淡水中成长^[14]。暗纹东方鲀肉质雪白且少刺, 味道尤为鲜嫩可口, 不仅含有大量的蛋白质和脂肪, 而且还有多种人体所含的必需氨基酸以及其他营养物质, 自古就享有“鱼中之王”和“菜肴之冠”的美名。在一些亚洲国家如中国、日本和朝鲜都有着久远的食用暗纹东方鲀的饮食习惯, 特别是在日本市场尤为畅销, 是我国十分重要的经济鱼类。暗纹东方鲀能成功地在纯淡水中养殖, 有着很高的经济价值, 所以暗纹东方鲀养殖业的发展是十分迅速的, 目前养殖规模也比较大, 其养殖区域正从沿海向内地迅速扩展。近

几年, 沿岸的河豚资源量因过度开发而表现出每年急剧减少的趋势, 为满足市场的需求, 就要扩大养殖河鲀的生产量^[15-16]。目前在暗纹东方鲀的养殖技术方面研究比较广泛, 但对其基因水平的了解知之甚少, 还没有暗纹东方鲀 MyoD 基因组全序列的报道。该试验使用反转录和 RT-PCR 方法, 对暗纹东方鲀 MyoD 基因进行克隆及生物信息学分析, 研究其基因序列的结构、进化关系及理化性质, 以期为进一步探究鱼类 MyoD 基因的结构与功能奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料 试验材料来自江苏南通中洋集团, 随机选择健康的 3 尾 3 月龄暗纹东方鲀幼鱼作为基因克隆的试验样本; 提取 RNA 的 Trizol 试剂、反转录试剂盒和 Taq 酶均购自 TaKaRa 生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 暗纹东方鲀总 RNA 提取与 cDNA 链合成。 剪取适量的暗纹东方鲀肌肉, 加入液氮后进行充分研磨, 使用 Trizol 法来提取暗纹东方鲀的总 RNA。提取后通过凝胶电泳检测来验证 RNA 纯度是否可以用于后续试验。使用 TaKaRa 反转录试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA, 反应体系为 20 μ L, 反应条件为 37 $^{\circ}$ C 15 min、85 $^{\circ}$ C 5 s, 共 1 个循环, 4 $^{\circ}$ C 保存。反应结束后将产物保存于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱以备后续试验使用。

1.2.2 基因引物设计与合成。 参考红鳍东方鲀的 MyoD 基因序列(NM_001032771) 设计暗纹东方鲀 MyoD 基因 CDS 区 PCR 引物。使用 Primer Premier 5.0 软件来设计克隆基因编码区全长所需的引物。引物序列由北京六合华大基因科技有限公司合成, 所合成的引物序列如表 1 所示。

1.2.3 基因克隆。 以反转录合成的 cDNA 为模板, 采用 RT-PCR 方法进行目的片段的扩增, PCR 反应体系 (25 μ L) 为

基金项目 国家海水鱼产业技术体系岗位科学家专项(CARS-47)。

作者简介 祁艳凤(1994—), 女, 辽宁营口人, 硕士研究生, 研究方向: 生物化学与分子生物学。* 通信作者, 教授, 博士, 硕士生导师, 从事分子生物学研究。

收稿日期 2020-12-20

表1 PCR扩增的引物序列

Table 1 The primer sequence of PCR amplification

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'→3')	退火温度 Annealing temperature//℃	作用 Function
MyoD-F	GCCTGTGAGATCTGAATG	59	CDS 克隆
MyoD-R	CAGGACTCTGGCTCTGAT	59	CDS 克隆

ddH₂O 14 μL、10×Buffer 2.5 μL、dNTP 2 μL, 上游引物 MyoD-F 和下游引物 MyoD-R 各 1 μL, 模板 4 μL, Taq 酶 0.5 μL。PCR 反应程序: 94 °C 预变性 5 min 进入循环; 94 °C 变性 30 s, 59 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共计 35 个循环, 4 °C 保存。将 PCR 产物在浓度为 1% 的琼脂糖凝胶中进行电泳, 结果所得条带清晰符合测序要求, 送往北京六合华大基因科技有限

表2 生物信息学分析网站及功能预测

Table 2 Bioinformatics analysis website and function prediction

软件 Software	网址 Website	功能预测 Function prediction
ProtParam	https://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/	理化性质分析
TMHMM Sever v.2.0	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/	跨膜区域预测
SignalP 5.0	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/	信号肽预测
ProtScale	http://web.expasy.org/protparam/	亲疏水性分析
PSORT II Prediction	https://psort.hgc.jp/form2.htm1	亚细胞定位预测
NetPhos 3.1	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos-3.1/	磷酸化位点分析
PSIPRED	https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?	二级结构预测
SWISS-MODEL	https://www.swissmodel.expasy.org/	三级结构预测

2 结果与分析

2.1 暗纹东方鲀总 RNA 提取及检测 使用 Trizol 法提取暗纹东方鲀肌肉的总 RNA, 其凝胶电泳结果显示, 提取的 RNA 效果比较好, 没有蛋白的污染。图 1 所展示的就是凝胶电泳检测条带, 5S、18S 和 28S 这 3 条带明亮清晰, 且宽度也比较适宜, 再通过使用分光光度仪进行检测, 结果显示 D_{260nm}/D_{280nm} 的值位于 1.8~2.0, 表明暗纹东方鲀肌肉的 RNA 提取效果良好, 可以用于之后的试验研究。

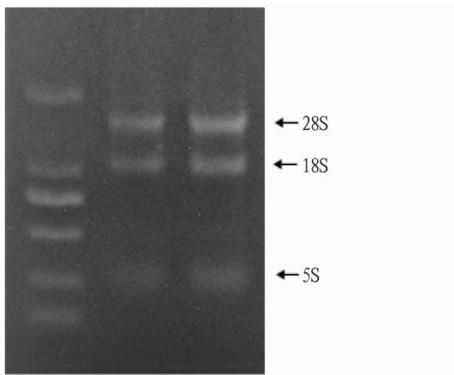


图1 暗纹东方鲀总 RNA 产物的 1% 琼脂糖凝胶电泳

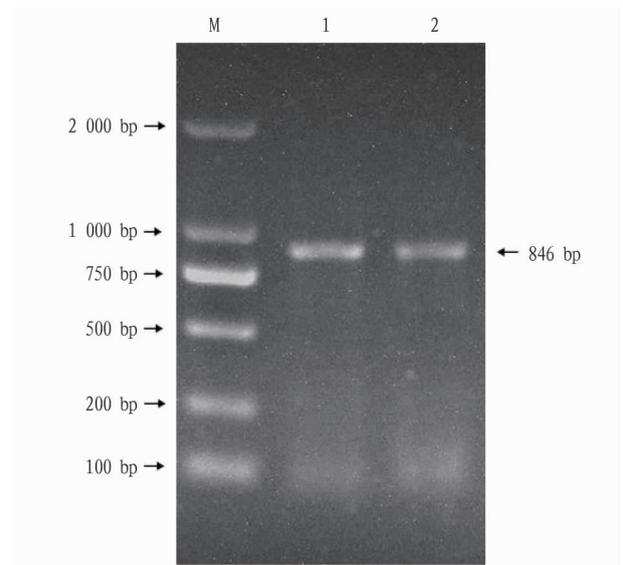
Fig.1 1% agarose gel electrophoresis of the total RNA products of *Takifugu obscurus*

2.2 基因克隆 通过 PCR 程序扩增所得到的目的产物的凝胶电泳检测结果如图 2 所示。在 750~1 000 bp 出现了一条清晰的 DNA 特异条带, 与预测扩增片段大小一致。由北京六合华大基因科技有限公司测序, 结果所得目的基因片段长

公司测序。

1.2.4 编码蛋白生物信息学分析。 该研究主要使用了生物信息学分析网站(表 2)来预测和分析了编码蛋白质理化性质、蛋白跨膜区域、信号肽、亲水性、疏水性、亚细胞定位、磷酸化位点、蛋白质二三级结构及系统进化树, 以期能够为后续分析该基因的功能提供基础数据。其中进化树构建中各物种氨基酸序列来自 NCBI 数据库, 分别为红鳍东方鲀(NP_001027941.1)、人(NP_002469.2)、斑马鱼(NP_571337.2)、罗非鱼(XP_031601968.1)、金头鲷(NM_030427111.1)、大口黑鲈(XP_643446.1)、非洲爪蟾(NP_001079366.1)、草鱼(AFL56774.1)、大鼠(NP_788268.2)、猪(NP_001002824.1)、鸡(NP_989545.2)、黄牛(NP_001035568.2)、绵羊(NP_001009390.1)、抹香鲸(XP_028357079.1)。

度为 846 bp。将测序所得结果通过 NCBI 中的 Blast 程序与红鳍东方鲀基因组数据库该基因全长序列进行对比后, 二者相似度高达 99%, 仅在 412 bp 处发生 1 个碱基的变化(A→G), 对应所编码的氨基酸也由苏氨酸变成了丙氨酸。



注: M.Marker; 1~2 表示样品 1~2

Note: M.Marker; 1~2 means sample 1~2

图2 暗纹东方鲀 MyoD 基因片段的 PCR 扩增产物

Fig.2 PCR amplification products of MyoD gene fragment of *Takifugu obscurus*

2.3 生物信息学分析 通过反转录和 RT-PCR 对暗纹东方

暗纹东方鲀 MyoD 基因的 cDNA 进行了克隆,得到了暗纹东方鲀 MyoD 基因 CDS 区序列。该编码区长度一共为 846 bp,起始密码子和终止密码子分别为 ATG、TAA。通过 Primer Premier 5.0 将核苷酸序列翻译成氨基酸序列,共翻译编码 281 个氨基酸,对其所编码蛋白继续进行生物信息学分析。

2.3.1 蛋白质理化性质分析。登陆 ProtParam (<https://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>) 分析 MyoD 基因氨基酸理化性质,结果表明,氨基酸总数为 281,其中 Ser、Leu 和 Arg 含量较多,分别为 16.0%、8.5% 和 7.8%,不含 Pyl 和 Sec,带负电的残基总数 (Asp + Glu) 为 35,带正电的残基总数 (Arg + Lys) 为 32,分子式为 $C_{1321}H_{2078}N_{398}O_{436}S_{14}$,分子量为 30 960.28 Da,脂肪指数为 62.56,理论等电点为 6.41,亲水性平均值 (GRAVY) 为 -0.667,半衰期为 30 h,不稳定指数为 70.51,为不稳定蛋白。

2.3.2 蛋白跨膜区域预测。通过 TMHMM Sever v.2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 输入暗纹东方鲀 MyoD 蛋白序列。暗纹东方鲀 MyoD 基因编码蛋白跨膜结构如图 3 所示,其中 X 轴代表氨基酸残基的数目,Y 轴表示跨膜结构可能性的分值(概率);红色线(transmembrane)代表跨膜区;蓝色线(inside)代表在膜内部的概率,概率极低;粉色线(outside)代表在膜外的概率,几乎 100%。由此可见,该蛋白不存在跨膜区,且该蛋白全部在膜外。

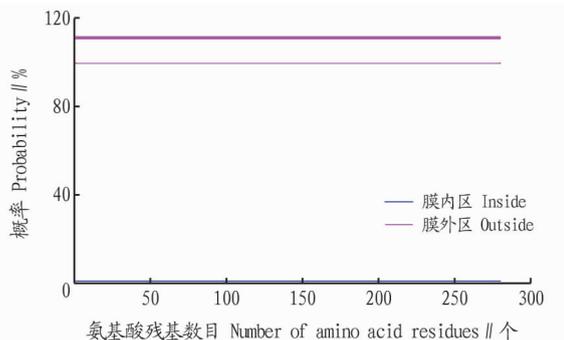


图 3 暗纹东方鲀 MyoD 编码蛋白的跨膜结构分析

Fig.3 Analysis of the transmembrane structure of the MyoD-encoded protein of *Takifugu obscurus*

2.3.3 暗纹东方鲀 MyoD 基因编码蛋白的信号肽分析。利用软件 SignalP 5.0 在线分析蛋白质的信号肽,发现无信号肽(图 4),说明 MyoD 基因所编码的不是分泌蛋白。

2.3.4 暗纹东方鲀 MyoD 蛋白的亲水性/疏水性预测与分析。利用位于 Expsay 的 ProtScale 在线分析软件进行蛋白质的亲疏水性分析,Amino acid scale 选择默认的 Hphob./Kyte & Doolittle,Window size 设置为 9,线性加权模型(图 5)。图形的高峰值(正值)的区域体现的是疏水区域,而负值的“低谷”区域体现的是亲水区域。正值越大的氨基酸具备更大的疏水性,负值越小的氨基酸则具备更大的亲水性。通过对图 5 的分析可得,该蛋白的氨基酸在 97 位处有最大值(1.544),在 75 和 76 位处有最小值(-2.533),MyoD 蛋白表现为亲水性。

2.3.5 蛋白亚细胞定位分析。利用 PSORT II Prediction 软件

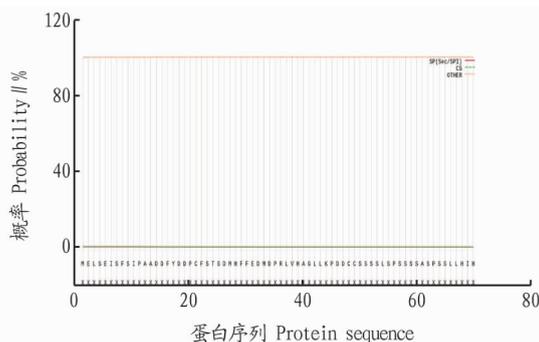


图 4 暗纹东方鲀 MyoD 编码蛋白的信号肽分析

Fig.4 Signal peptide analysis of MyoD-encoded protein of *Takifugu obscurus*

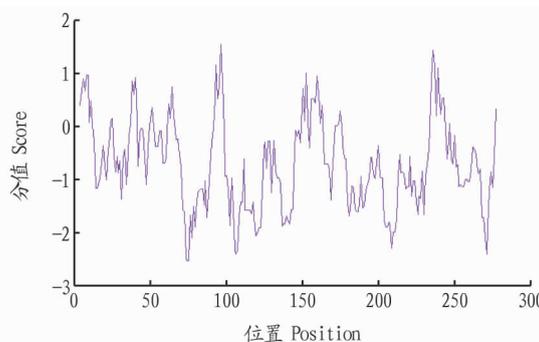


图 5 暗纹东方鲀 MyoD 基因蛋白的亲水性/疏水性预测与分析

Fig.5 Hydrophilicity/hydrophobicity prediction and analysis of MyoD gene protein in *Takifugu obscurus*

对暗纹东方鲀 MyoD 蛋白进行亚细胞定位分析,结果显示,该蛋白在细胞核中分布最多,为 56.5%;在细胞骨架中分布最少,为 8.7%;细胞质和线粒体分别为 21.7% 和 13.0%。

2.3.6 暗纹东方鲀 MyoD 蛋白的磷酸化位点预测。利用 NetPhos 3.1 软件来预测其磷酸化位点,在暗纹东方鲀 MyoD 基因编码的氨基酸中共发现有 82 个 Ser 磷酸化位点、15 个 Thr 磷酸化位点、5 个 Tyr 磷酸化位点(图 6)。

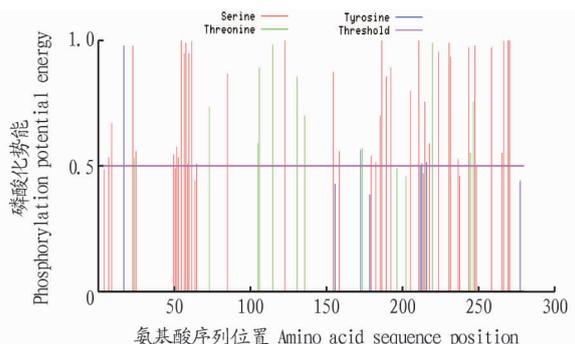


图 6 暗纹东方鲀 MyoD 磷酸化位点分析

Fig.6 Analysis of MyoD phosphorylation sites in *Takifugu obscurus*

2.3.7 基因编码蛋白质结构预测。

2.3.7.1 蛋白质二级结构预测。蛋白质的理化性质和各功能取决于其空间结构,利用 PSIPRED 在线分析软件对 MyoD 蛋白二级结构进行预测(图 7),从图 7 可以看出二级结构预测的置信度 (Conf)、二级结构图标 (Cart)、二级结构字符表

示(Pred)和氨基酸序列及编号(AA)。暗纹东方鲀 MyoD 基因编码蛋白序列中只含有 α 螺旋(Helix)、无规则卷曲(Coil)和 β 折叠(Strand),不含有 β 转角以及其他已知的结构域。

2.3.7.2 蛋白质三级结构预测。登陆 SWISS-MODEL 网站 (<https://www.swissmodel.ex-pasy.org/>) 预测该基因编码蛋白质三级结构,预测结果如图 8 所示。

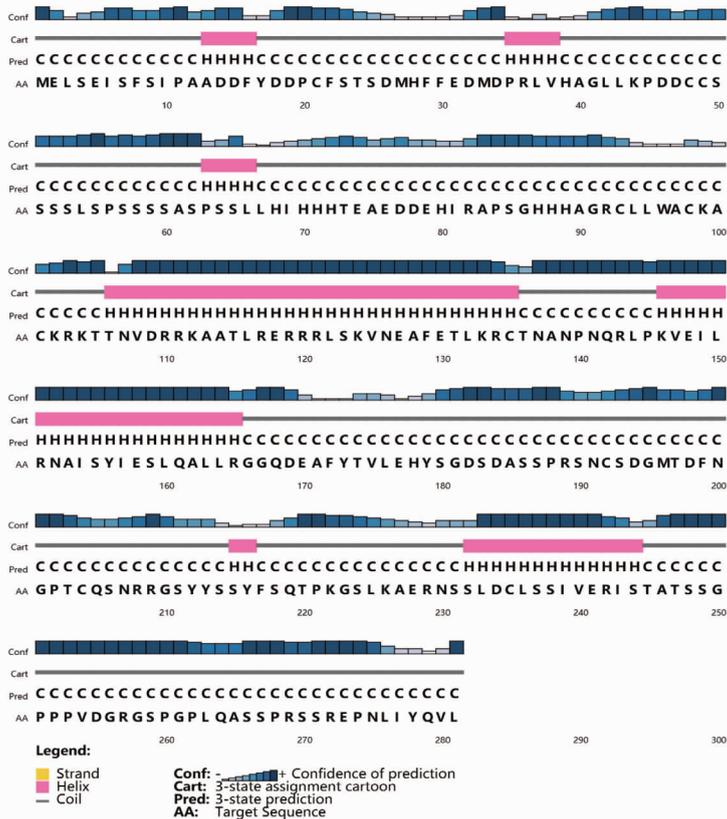


图 7 暗纹东方鲀 MyoD 基因编码蛋白的二级结构预测分析

Fig.7 Prediction analysis of the secondary structure of the protein encoded by the MyoD gene of *Takifugu obscurus*

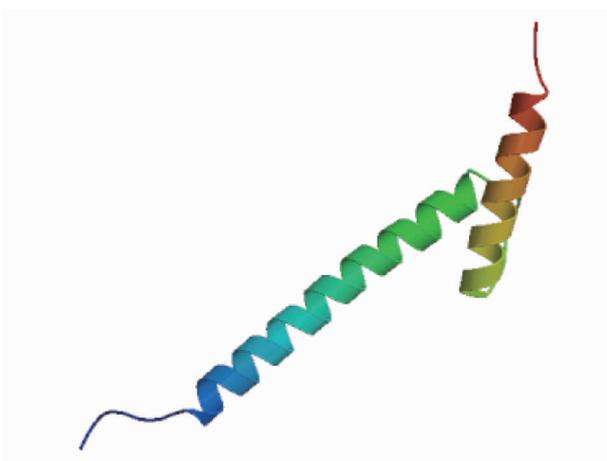


图 8 蛋白质三级结构预测

Fig.8 Prediction of protein tertiary structure

2.3.8 系统进化树。使用 MEGAX 分子遗传进化分析软件,对暗纹东方鲀(*Takifugu obscurus*)和人(*Homo sapiens*)、斑马鱼(*Danio rerio*)、罗非鱼(*Oreochromis aureus*)、金头鲷(*Sparus aurata*)、大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)、红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)、非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)、草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)、大鼠(*Rattus norvegicus*)、猪(*Sus scrofa*)、鸡(*Gallus gallus*)、黄牛(*Bos taurus*)、绵羊(*Ovis aries*)、抹香

鲸(*Physeter catodon*) 14 个物种以临近相连算法构建系统进化树,红点为暗纹东方鲀分支。由进化树可表明,暗纹东方鲀与红鳍东方鲀的亲缘关系最近;其次为罗非鱼、大黑口鲈、金头鲷。

3 讨论与结论

MyoD 基因第一次被成功克隆出来是由 Davis 在 1987 年所完成的。作为生肌调节因子 MRFs 家族的主要成员之一,MyoD 基因不论是对骨骼肌的形成还是分化都起着十分重要的作用^[17-19]。该研究首次克隆并测出暗纹东方鲀 MyoD 基因的 CDS 区核苷酸序列,进而对其进行了生物信息学分析,得到其片段长度为 846 bp,共编码 281 个氨基酸,这与红鳍东方鲀 MyoD 基因编码区一致。该试验结果显示,暗纹东方鲀 MyoD 基因 A、G、T、C 碱基分别为 21.40%、26.12%、18.44% 和 34.04%,与红鳍东方鲀 MyoD 基因碱基序列相似度为 99%,仅在 412 bp 处有碱基 A→G 的变化,这一碱基的突变引起了氨基酸序列的改变,因此该位点突变应为错义突变。将该序列与其他物种的 MyoD 基因进行同源性比较,结果发现暗纹东方鲀与红鳍东方鲀同源性最高,与哺乳动物的同源性较低。这与传统的生化特征分类和形态学分类的进化地位是相符合的,进一步说明 MyoD 基因在对物种与物种间的系统进化关系的研究中是具有一定价值的^[20-24]。

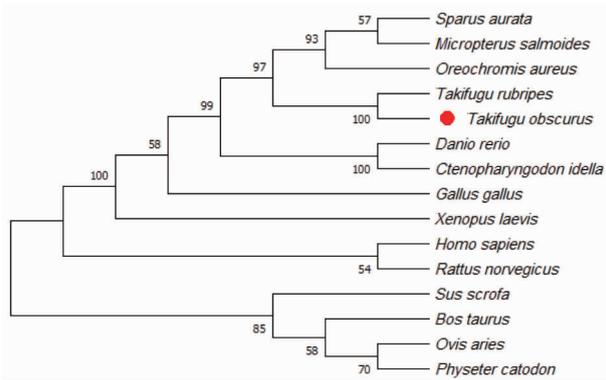


图9 暗纹东方鲀 MyoD 氨基酸序列系统进化树分析

Fig.9 Phylogenetic tree analysis of the amino acid sequence of MyoD in *Takifugu obscurus*

生物信息学分析结果显示,暗纹东方鲀 MyoD 基因分子量为 30 960.28 Da,理论等电点为 6.41,亲水性平均值(GRA-VY)为-0.667,脂肪指数为 62.56,半衰期为 30 h,不稳定指数为 70.51,其多肽链表现出亲水性,为不稳定蛋白。通过软件 TMHMM 和 SignalP 5.0 在线分析可知,MyoD 蛋白全部在膜外且不存在跨膜区也无信号肽,说明其不是分泌蛋白,这个结果与 MyoD 基因只在骨骼肌细胞特异表达的组织特异性一致。二级结构预测结果显示,暗纹东方鲀 MyoD 基因编码蛋白序列中只含有 α 螺旋(Helix)、无规则卷曲(Coil)和 β 折叠(Strand),不含有 β 转角以及其他已知的结构域。由于暗纹东方鲀 MyoD 三级结构仅有部分模型,因此无法预测完整的三级结构。在线预测发现,MyoD 基因存在磷酸化位点共 102 个,其中有 82 个 Ser 磷酸化位点、15 个 Thr 磷酸化位点、5 个 Tyr 磷酸化位点,由此可以敲定,MyoD 蛋白在肌肉与骨骼生长发育中所起作用在一定程度上与这些磷酸化位点有着紧密联系,其亚细胞主要定位在细胞核中。

该试验通过 RT-PCR 克隆了 MyoD 基因的编码区,并对其进行了基础的生物信息学分析,为以后对该基因的结构和功能的深入研究奠定了一定基础,以期能够为改良暗纹东方鲀的肉质作出贡献。

参考文献

- [1] SABOURIN L A, RUDNICKI M A. The molecular regulation of myogenesis [J]. *Clinical genetics*, 2000, 57(1): 16-25.
- [2] ALVES H J, ALVARES L E, GABRIEL J E, et al. Influence of the neural tube/notochord complex on MyoD expression and cellular proliferation in chicken embryos [J]. *Brazilian journal of medical & biological research*, 2003, 36(2): 191-197.
- [3] ZOU G W, ZHU Y Y, LIANG H W, et al. Association of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and myogenic factor 6 genes with growth traits in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Aquaculture international*,

2015, 23(5): 1217-1225.

- [4] ZHONG X, WANG Q Q, LI J W, et al. Ten-eleven translocation-2 (Tet2) is involved in myogenic differentiation of skeletal myoblast cells *in vitro* [J]. *Scientific reports*, 2017, 7: 1-11.
- [5] 于凌云, 白俊杰, 叶星, 等. 大口黑鲈 MyoD cDNA 的克隆和序列分析 [J]. *生物技术通报*, 2008(S1): 301-306.
- [6] 项露颖, 孙雨敏, 姜怀志. 生肌决定因子(MyoD)基因家族调控动物生产性能发挥的研究概述 [J]. *现代畜牧兽医*, 2016(2): 54-58.
- [7] 王立新. 草鱼 MyoD 基因 cDNA 克隆和表达研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2005.
- [8] AKIZAWA Y, KANNO H, KAWAMICHI Y, et al. Enhanced expression of myogenic differentiation factors and skeletal muscle proteins in human amnion-derived cells via the forced expression of MYOD1 [J]. *Brain & development*, 2013, 35(4): 349-355.
- [9] BLUM R, DYNLACHT B D. The role of MyoD1 and histone modifications in the activation of muscle enhancers [J]. *Epigenetics*, 2013, 8(8): 778-784.
- [10] LIU C, MCFARLAND D C, VELLEMAN S G. Effect of genetic selection on MyoD and myogenin expression in turkeys with different growth rates [J]. *Poultry science*, 2005, 84(3): 376-384.
- [11] AVEROUS J, GABILLARD J C, SEILIEZ I, et al. Leucine limitation regulates myf5 and myoD expression and inhibits myoblast differentiation [J]. *Experimental cell research*, 2012, 318(3): 217-227.
- [12] 成嘉, 褚武英, 张建社. 鱼类肌肉组织发生和分化相关基因的研究进展 [J]. *生命科学研究*, 2010, 14(4): 355-362.
- [13] 卢中华, 俞菊华, 李红霞, 等. 奥利亚罗非鱼 MyoD1 和 MyoD2 基因特征及差异 [J]. *中国水产科学*, 2010, 17(5): 903-912.
- [14] 蒋天明, 罗兴春, 吴江. 暗纹东方鲀养殖技术 [J]. *淡水渔业*, 2001, 31(4): 14-17.
- [15] 马爱军, 陆雨君, 陈超, 等. 东方鲀属主要经济鱼种繁育养殖、育种和基因研究现状 [C] // 第三届全国现代生态渔业管理与技术研究. 北京: 中国水利技术信息中心, 2011.
- [16] 廖章斌, 徐后国, 卫育良, 等. 河鲀营养研究进展及展望 [J]. *动物营养学报*, 2018, 30(4): 1286-1296.
- [17] KABLAR B, KRSTEL K, TAJBAKHS S, et al. Myf5 and MyoD activation define independent myogenic compartments during embryonic development [J]. *Developmental biology*, 2003, 258(2): 307-318.
- [18] DAVIS R L, WEINTRAUB H, LASSAR A B. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts [J]. *Cell*, 1987, 51(6): 987-1000.
- [19] STUHL MILLER T J, GARCÍA-CASTRO M I. Current perspectives of the signaling pathways directing neural crest induction [J]. *Cellular and molecular life sciences*, 2012, 69(22): 3715-3737.
- [20] 刘宏祥, 徐文娟, 宋卫涛, 等. 高邮鸭群体 MSTN、MyoD1 和 MyoG 基因外显子中 SNP 位点的分析 [J]. *江苏农业学报*, 2015, 31(3): 604-612.
- [21] 王立新, 白俊杰, 叶星, 等. 草鱼 MyoD cDNA 的克隆和序列分析 [J]. *中国农业科学*, 2005, 38(10): 2134-2138.
- [22] GALLOWAY T F, BARDAL T, KVAM S N, et al. Somite formation and expression of MyoD, myogenin and myosin in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) embryos incubated at different temperatures: Transient asymmetric expression of MyoD [J]. *Journal of experimental biology*, 2006, 209(13): 2432-2441.
- [23] FERNANDES J M O, KINGHORN J R, JOHNSTON I A. Differential regulation of multiple alternatively spliced transcripts of MyoD [J]. *Gene*, 2007, 391(1/2): 178-185.
- [24] ANDERSEN ϕ , DAHLE S W, VAN NES S, et al. Differential spatio-temporal expression and functional diversification of the myogenic regulatory factors MyoD1 and MyoD2 in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) [J]. *Comparative biochemistry & physiology part B: Biochemistry & molecular biology*, 2009, 154(1): 93-101.

(上接第 79 页)

- [15] 周大颖, 杨小生, 杨波, 等. 黔产毛子草化学成分研究 [J]. *天然产物研究与开发*, 2007, 19(5): 807-808.
- [16] 田丹, 任艳芳, 王艳玲, 等. 镉胁迫对生菜种子萌发及幼苗抗氧化酶系统的影响 [J]. *北方园艺*, 2018(2): 15-21.
- [17] 吴让啸, 朱珠, 常耀, 等. 镉胁迫对 6 种菊科花卉种子萌发及幼苗生长的影响 [J]. *分子植物育种*, 2020, 18(19): 6483-6490.

- [18] 杨株, 贾乐, 毕玉芬, 等. 7 种紫花苜蓿对云南某铅锌矿区土壤镉铅的累积特征及品种差异 [J]. *农业资源与环境学报*, 2018, 35(3): 222-228.
- [19] 韩多红, 孟红梅, 王进, 等. 镉对紫花苜蓿种子萌发等生理特性的影响 [J]. *干旱地区农业研究*, 2007, 25(5): 151-154, 171.
- [20] 陈丽丽, 付媛媛, 王艳萍, 等. 镉胁迫对小麦和 2 种杂草种子萌发及幼苗生长的影响 [J]. *西南林业大学学报*, 2019, 39(1): 50-57.
- [21] 张琼. 镉对几种常见蔬菜种子萌发影响的研究 [J]. *农业环境科学学报*, 2006, 25(S2): 480-486.