

不同日龄皖南三黄鸡肌肉中 *MyoD* 基因表达及相关分析

范心凤¹, 金四华¹, 高斌², 周豫¹, 徐媛¹, 陈先臻¹, 杨丹¹, 刘平³, 耿照玉^{1*}

(1 安徽农业大学动物科技学院, 合肥 230036; 2 青阳县畜牧兽医局 池州 242800;

3 青阳县平云牧业开发有限公司, 池州 242800)

摘要:为研究生肌因子 *MyoD* 基因在皖南三黄鸡不同发育阶段肌肉组织中的表达水平及其与肌肉重量的相关分析。分别于胚胎发育的 11 胚龄、1 日龄、70 日龄、98 日龄采集胸肌和腿肌组织, 并测定 1 日龄、70 日龄、98 日龄和 126 日龄的胸肌重、腿肌重和体重, 采用实时荧光定量 PCR 方法分析 *MyoD* 基因在不同阶段胸肌和腿肌中的相对表达量。结果表明, 胸肌中 *MyoD* 基因随着日龄的增加其相对表达量呈降低的趋势; 腿肌中 *MyoD* 基因随着日龄的增长其表达量呈先增加后降低的趋势。相关性分析表明, *MyoD* 基因的相对表达量与胸肌重呈显著负相关。研究结果提示 *MyoD* 基因相对表达量与肌肉发育相关, 为进一步研究 *MyoD* 基因对鸡肌肉发育的调控作用提供重要的参考。

关键词: 皖南三黄鸡; *MyoD* 基因; 荧光定量 PCR; 肌肉发育; 基因表达

中图分类号: S831.2

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2019)05-0785-06

Expression and correlation of *MyoD* in muscle tissues at different ages in Wannan Yellow chickens

FAN Xinfeng¹, JIN Sihua¹, GAO Bin², ZHOU Yu¹, XU Yuan¹,
CHEN Xianzhen¹, YANG Dan¹, LIU Ping³, GENG Zhaoyu¹

(1. School of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;

2. Animal Husbandry Bureau of Qingyang County, Chizhou 242800;

3. Qingyang County Pingyun Animal Husbandry Development, Co. Ltd., Chizhou 242800)

Abstract: The aim of this study was to investigate the expression level of *MyoD* (Myogenic determining factor) gene in muscle tissue at different developmental stages of Wannan Yellow chicken and its correlation with muscle weight. The pectorals and legs muscle tissues were collected at the embryonic age of 11, 1, 70 and 98 days, respectively, and pectorals muscle weight, legs muscle weight and body weight were measured at 1, 70, 98 and 126 days of age. Real-time fluorescence quantitative PCR was used to analyze the expression level of *MyoD* gene in different stages of Pectorals and legs muscle. The results showed that the relative expression of *MyoD* gene in the pectoral muscle decreased with the increase of age. The expression of *MyoD* gene in the leg muscle increased first and then decreased with the increase of age. The result suggests that the relative expression of *MyoD* gene is related to muscle development, which provides an important reference for further study on the regulation of *MyoD* gene on chicken muscle development.

Key words: Wannan Yellow chicken; *MyoD*; quantitative PCR; muscle development; gene expression

MyoD (生肌决定因子) 是生肌调节因子 (*MRFs*) 家族的四个成员之一, 是一种碱性螺旋-环-螺旋 (bHLH) 转录因子, 在肌源性分化以及骨骼肌增生和肥大中起着重要作用^[1], 其基因定位在

鸡的 5 号染色体上^[2-3]。1987 年, Davis 等人首次实现 *MyoD* 基因的克隆, 揭示了该基因对骨骼肌的分化和组织修复等方面的重要作用^[4]。*MyoD* 基因可以激活嵌入在封闭染色质中的肌肉基因, 从而启动非

收稿日期: 2019-03-05

基金项目: 安徽省重点研究与开发计划项目 (1704a07020091), 安徽省自然科学基金项目 (1808085QC61) 和安徽和地方畜禽遗传资源保护与生物育种安徽省重点实验室 (AKLGRCB2017008) 共同资助。

作者简介: 范心凤, 硕士研究生。E-mail: fxf1713799159@163.com

* 通信作者: 耿照玉, 教授, 博士生导师。E-mail: gzy@ahau.edu.cn

肌肉细胞向肌肉细胞的转化^[5], 而 *MyoD* 基因的缺失则促进成肌细胞向棕色脂肪组织转化^[6]。此外, *MyoD* 基因的表达调控畜禽的肌肉生长和分化并对畜禽肉质起到一定影响。Li 等^[7]研究金定鸭与高邮鸭肌肉纤维发育中发现 *MyoD* 基因的表达与 IIb 型纤维百分比呈显著正相关, 表明 *MyoD* 在肌肉发育的次级肌细胞生成过程中可能具有调控肌肉分化的潜在功能。Lee 等^[8]研究发现 *MyoD* 基因变异对猪肌肉纤维特性、瘦肉生产特性、肉质特性等存在显著影响, 其被认为是猪肉品质性状的候选基因^[9]。大量研究表明 *MyoD* 基因在肌肉生长发育中起着重要作用。然而, 有关 *MyoD* 基因在地方鸡不同发育时期的肌肉组织中的表达模式研究较少。

皖南三黄鸡是安徽省重要的优质地方畜禽品种, 其以独特风味和鲜美的肉质风靡华东地区^[10]。因此, 本研究选取皖南三黄鸡作为试验材料, 应用荧光定量 PCR(qPCR)技术, 研究了 *MyoD* 基因在地方鸡不同发育时期及不同肌肉组织中的表达及其与肌肉重量关系。探究 *MyoD* 基因在皖南三黄鸡胸腿肌发育过程中的作用, 为进一步研究 *MyoD* 基因对皖南三黄鸡肌肉发育的调控作用提供重要的参考。

1 材料与方法

1.1 试验动物

本试验动物由青阳县平云牧业开发有限公司(皖南三黄鸡省级保种场)提供, 试验动物的饲养与管理参照公司的饲养管理规程, 选取 10 只健康强健、体重相近的皖南三黄鸡公鸡, 按照 1:10 比例(1♂×10♀), 组建 10 个试验家系, 在 30 周龄产蛋高峰期时, 人工授精, 收集 10 d 种蛋, 共约 750 枚。出雏时, 雌雄鉴别, 戴翅号, 正常饲养。试验鸡日粮组成成分如表 1。

1.2 样本选择与组织采集

选取同一家系皖南三黄鸡作为试验对象。在孵化第 11 天(E11)收集 40 枚活胚胎, 根据孵化期胚胎性腺发育情况, 挑选 10 只公鸡, 采集胸肌和腿肌。在出雏当天(D1)、第 70 日龄(D70)、98 日龄(D98)、126 日龄(D126)4 个阶段分别挑选健康强健、体重相近的皖南三黄鸡公鸡 10 只称量体重并记录, 断颈屠宰后取每只鸡的整个胸肌和腿肌分别称重记录。然后采集胸大肌和腿肌, 采集的所有组织样立即放入 RNA later 液中保存(Thermo Fisher Scientific, 美国公司), 随后于-80℃冰箱保存备用。

1.3 总 RNA 提取与质量检测

利用 BIOMEGA 试剂盒法(货号 R7311, 美

国), 从胸肌和腿肌中提取总 RNA。采用 NanoDrop 2000 分光光度计(Thermo Fisher Scientific, Santa Clara, CA, USA)测定 RNA 的浓度、 OD_{260} 与 OD_{280} , 通过 OD_{260}/OD_{280} 值确定 RNA 的纯度, 用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性。

表 1 日粮成分与营养水平表(风干基础)

Table 1 Dietary ingredients and nutrient levels of the basal diet (air-dry basis)

项目 Item	0~6 周	7~20 周
营养成分 Nutritional ingredient		
玉米 Corn	50.75	42.82
小麦 Wheat	5	18
米糠 Rice bran	5	3
豆粕 46% Bean pulp 46%	29.38	23.49
美国 DDGS America DDGS	2	3
玉米淀粉渣 Corn starch residue	3	3
碳酸氢钙 Calcium bicarbonate	1	0.66
石粉 Mountain flour	1.06	1.03
大豆油 Soybean oil	1.12	3.39
食盐 Salt	0.25	0.26
赖氨酸 Lysine	0.46	0.43
蛋氨酸 Methionine	0.23	0.18
添加剂 Additive	0.75	0.74
合计 Total	100	100
营养水平 Nutritional level %		
代谢能 Metabolizable energy	12.12	11.7
粗蛋白 Crude protein	20	15
赖氨酸 Lysine	0.9	0.75
蛋氨酸 Methionine	0.38	0.29
苏氨酸 Threonine	0.58	0.52
蛋氨酸+胱氨酸 Methionine and Cystine	0.69	0.61

注: 代谢能单位是 $\text{MJ}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

Note: the unit of metabolic energy is $\text{MJ}\cdot\text{kg}^{-1}$.

1.4 反转录

采用 Easyscript one-step GDNA Removal and CDNA Synthesis Supermix 一步法反转录试剂盒(全式金)。按照试剂盒说明书加入 Anchored Oligo(dt)18 Primer ($0.5\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) 1 μL , 2XES Reaction Mix 10 μL , EasyScript[®]/RI Enzyme Mix 1 μL , EDNA Remover 1 μL , Total RNA+RNase-free Water 7 μL 。总共 20.0 μL 体系, 混匀, 在 PCR 仪中 42℃ 孵育 15 min, 85℃ 加热 5 s 失活。温度降至 4℃ 终止反应, 反转录的 cDNA 4℃ 保存, -20℃ 长期保存。

1.5 实时荧光定量 PCR

从 GenBank 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 中获得与肌肉发育相关基因 *MyoD* 的 mRNA

序列。采用 premier 5.0 软件 (Primer Premier 5.0, Palo Alto, CA, USA) 设计目的基因的引物对。引物序列如表 2 所示。所有引物均由擎科生物合成公

司南京合成部合成。合成后将 β -actin 和 *MyoD* 引物分别稀释成 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 备用。

表 2 用于定量 PCR 的引物序列

Table 2 Primer sequences used for quantitative PCR

基因 Gene	引物序列(5'→3') Primer sequence	产物长度/bp Product Size	退火温度/°C Annealing temperature
<i>MyoD</i>	F: CGACGGCATGATGGAGTACA R: ATGCTTGAGAGGCAGTCGAG	144	60
β -actin	F: CGGACTGTTACCAACACCCA R: TCCTGAGTCAAGCGCCAAAA	115	60

采用 ABI7500 荧光定量 PCR 仪, 用等比稀释 10 倍的方法将 PCR 产物稀释成一系列标准品, 以此标准品为模板进行实时定量 PCR。每个样品重复 3 次, 根据 Ct 值以及相应标准品的浓度制作标准曲线。反应液的总体积为 $20 \mu\text{L}$: $2\times\text{NovoStart}^{\text{®}}$ SYBR QPCR SuperMix Plus, $10 \mu\text{L}$, Forward Primer, $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $1 \mu\text{L}$, Reverse Primer, $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $1 \mu\text{L}$, Template DNA $1 \mu\text{L}$, ROX II $0.4 \mu\text{L}$ 滴加 RNase-Free Water 至 $20 \mu\text{L}$ 。使用 ABI 7500 Real Time PCR 仪, 反应条件为 95°C 预变性 1 min , 95°C 变性 20 s , 60°C 退火和延伸 1 min , 共 40 个循环。

1.6 统计分析

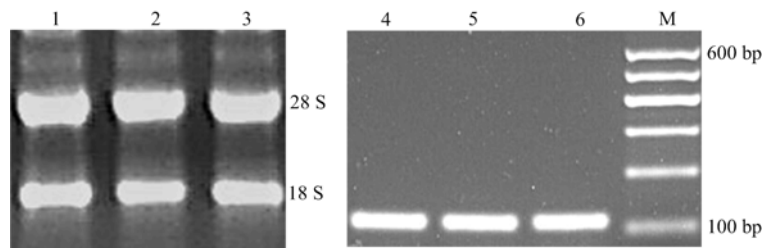
将所测得的原始数据输入到 Excel 软件进行处理。根据所测得的内参基因和目的基因的 Ct 值计算目的基因的相对表达量。运用 SPSS20.0 软件 (SPSS

Inc., Chicago, IL) 中的单因素方差分析, 对不同阶段 *MyoD* 基因表达差异进行分析。采用 Duncan (邓肯法) 进行显著差异性检验, 将 $P < 0.05$ 表示为差异显著, $P < 0.01$ 表示为差异极显著。采用 Pearson Correlation 对 *MyoD* 基因表达量与肌肉重量进行相关性分析。数据表示为平均值 \pm 标准差。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 与反转录检测

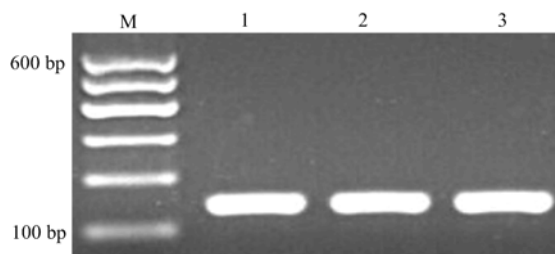
由图 1A 可见, 从皖南三黄鸡胸肌和腿肌提取的 RNA 在电泳中分为清晰的 28 S 和 18 S 两条带, 表明 RNA 完整性很好, 提取过程中未发生降解。用 NanoDrop 2000 分光光度计检测, 所有样品的 OD_{260}/OD_{280} 均在 $1.8\sim 2.1$, 结果表明, RNA 样品纯度高, 满足了后续检验的需要。反转录后, 用琼脂



M: DNA marker; 1-3: Total RNA; 4-6: β -actin

图 1 总 RNA (A) 和 β -actin (B) PCR 产物电泳图

Figure 1 The agarose electrophoresis of total RNA and PCR product of β -actin



M: DNA marker; 1-3: PCR products of the *MyoD* gene

图 2 *MyoD* 基因 PCR 扩增图

Figure 2 PCR products of the *MyoD* gene by the agarose electrophoresis

糖凝胶电泳检测内参基因 β -actin PCR 扩增的结果。结果由图 1B 可见, 结果扩增出 115 bp 的目的条带与 Marker 比对是吻合的, 表明合成的 cDNA 完整性好, 能满足后续 PCR 反应。

2.2 目的基因标准品制备

通过琼脂糖凝胶电泳检测 *MyoD* 基因的常规 PCR 结果, 如图 2 所示。目的基因 *MyoD* 片段长度是 144 bp , 说明扩增片段与目的基因片段大小一致, 引物特异性能良好 (图 3), PCR 产物经 Sanger 测序, 测序结果与 NCBI 数据库中 *MyoD* 序列同源性

为 100%，表明 *MyoD* 基因标准品构建成功，满足后续 qPCR 试验需要。

2.3 不同阶段皖南三黄鸡体重和肌肉重的比较

随着日龄的增长，体重、胸肌重、腿肌重呈线性增长，其中，体重在 70~98 日龄增长速度最快。1 日龄时，胸肌重与腿肌重相似，随日龄的增长，腿肌的增长速度比胸肌快。见图 3A 和 3B。

2.4 *MyoD* 基因在胸肌中的表达量

皖南三黄鸡胸肌中 *MyoD* 基因在不同日龄中的表达规律如图 4。随日龄的增长，*MyoD* 基因的表达量呈降低趋势。其中，11 胚龄和 1 日龄 *MyoD* 基因表达量无显著性差异 ($P > 0.05$)，但是均显著高于

70 与 98 日龄 ($P < 0.05$)；70 日龄 *MyoD* 基因表达量显著高于 98 日龄 ($P < 0.05$)。

2.5 *MyoD* 基因在腿肌中的表达量

皖南三黄鸡腿肌中 *MyoD* 基因在不同胚龄/日龄中的表达规律如图 5。70 日龄 *MyoD* 基因表达量显著高于其他发育阶段，与 11 胚龄、1 日龄和 98 日龄 *MyoD* 基因表达量之间差异均不显著 ($P > 0.05$)。

2.6 *MyoD* 基因的表达量与肌肉重量的相关性分析

由表 3 可见，皖南三黄鸡 *MyoD* 基因表达与胸肌组织重变化呈极显著负相关 ($P < 0.01$)，*MyoD* 基因表达与腿肌重无显著相关性 ($P > 0.05$)。

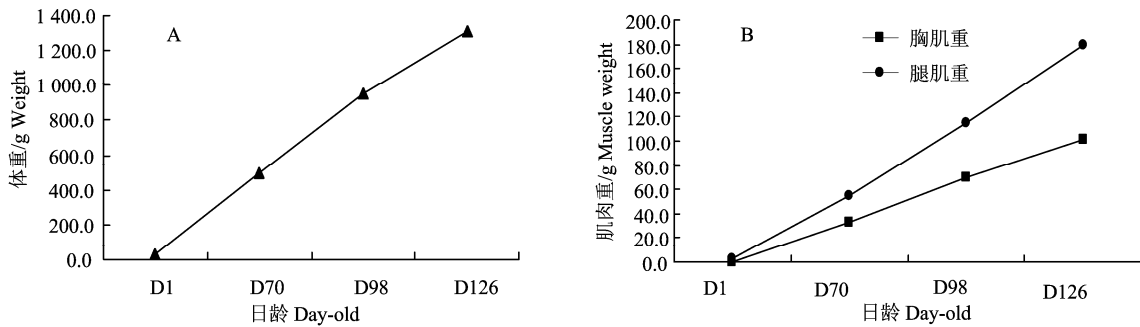
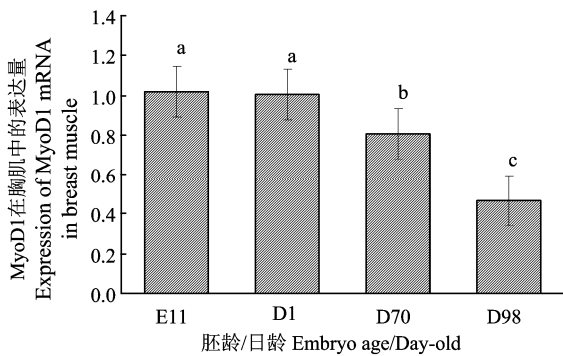


图 3 不同阶段皖南三黄鸡体重和肌肉重的比较

Figure 3 Comparison of weight and muscle weight of Wannan Yellow chickens at different stages

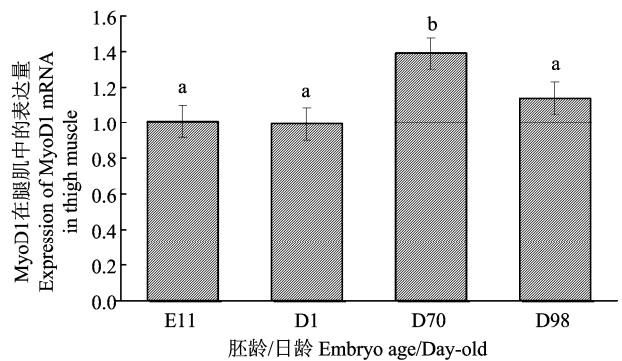


同一组织不同胚龄/日龄间不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)

Different lowercase letters mean significant different ($P < 0.05$)

图 4 皖南三黄鸡胸肌中 *MyoD* mRNA 发育性表达变化

Figure 4 Expression change of *MyoD1* mRNA in breast muscle of Wannan Yellow chickens



同一组织不同胚龄/日龄间不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)

Different lowercase letters mean significant different ($P < 0.05$)

图 5 皖南三黄鸡腿肌中 *MyoD* mRNA 发育性表达变化

Figure 5 Expression change of *MyoD* mRNA in thigh muscle of Wannan Yellow chickens

3 讨论

MyoD 基因家族对调控骨骼肌的发育起着重要作用，其中 *MyoD* 主要在肌肉发育初级阶段发挥作用^[11]。*MyoD* 其蛋白结构由一个残基和一个中央蛋白基序组成，包含大量精氨酸和赖氨酸，*MyoD* 是促进肌肉纤维的形成并调控一系列肌肉发育相关的

关键转录因子^[5]。Akizawa 等研究表明，*MyoD* 与肌球蛋白、肌细胞生成素及肌酸激酶等基因的启动子区域结合，正向调节骨骼肌的生长和发育^[12-13]。目前，对 *MyoD* 基因的研究集中于分子调控机制及其对肌肉发育和分化的影响^[14-17]。然而，其在地方鸡不同发育阶段肌肉中的表达模式的研究相对较少，因此，本试验利用 qPCR 对 *MyoD* 基因在皖南三黄

鸡不同生长发育阶段及不同肌肉组织中的表达差异进行研究。

表 3 皖南三黄鸡不同肌肉组织中 *MyoD* 基因与其肌肉组织重的相关性

Table 3 Correlation analysis of *MyoD* genes and muscle weight in different muscle tissue of Wannan Yellow chicken

组织	胸肌	腿肌
Muscle tissue	Breast muscle	Thigh muscle
相关性	-0.946**	0.180
Correlation		

* 表示差异显著($P < 0.05$), ** 表示差异极显著($P < 0.01$)。

* means significant differences ($P < 0.05$), **represents extremely significant differences ($P < 0.01$).

Ropka-Molik 等^[18]研究表明, *MyoD* 基因在皮特兰猪和波兰长白猪发育早期的表达高于发育后期。Liu 等^[19]研究 *MyoD* 基因在火鸡胚胎发育过程中的表达, 表明随着胚胎的发育, *MyoD* 基因表达水平显著降低。范红英等^[3]检测 *MyoD* 基因在 86、155、213、300、394 和 454 日龄惠阳胡须鸡胸肌和腿肌中的表达量, 表明 *MyoD* 基因仅在 86 日龄腿肌中有低水平的表达。揭示 *MyoD* 基因在肌肉发育早期发挥作用。本试验研究结果表明, 在皖南三黄鸡胸肌中, *MyoD* 基因在 11 胚龄与 1 日龄时表达量较高, 70 日龄和 98 日龄表达水平显著下降。腿肌中, *MyoD* 基因的表达量在 70 日龄时达到高峰, 随后显著下降。进一步说明 *MyoD* 基因主要在肌肉发育初级阶段发挥作用。Zhang 等^[20]研究 *MyoD* 基因在藏鸡 0、81、119、154 和 210 日龄肌肉中的表达情况, 表明 *MyoD* 基因在 0 日龄藏鸡胸肌中表达量达到高峰, 81 日龄显著下降, 随后低水平稳定表达; 在腿肌中, *MyoD* 基因在 81 日龄表达量下降, 119 日龄表达量显著上升并达到高峰, 154 和 210 日龄表达量稍有降低。刘宏祥等^[21]研究表明, 在金定鸭 8~12 胚龄腿肌中, *MyoD* 的表达量无明显变化。王珍^[22]对 *MyoD* 基因在 AA 肉鸡和优质肉鸡 HSI 肌肉中的表达进行分析, 结果表明, 不同品种、不同组织中 *MyoD* 基因的表达模式不同。本试验结果表明, *MyoD* 基因在鸡 11 胚龄和 1 日龄胸肌中表达量较高, 在腿肌中, 70 日龄时表达量较高。*MyoD* 基因在皖南三黄鸡胸肌和腿肌中的表达模式不一致。这可能与胸肌和腿肌的不同起源有关^[23]。

王珍^[22]研究表明 AA 肉鸡和优质肉鸡 HSI 中 *MyoD* 的表达量与胸肌重和腿肌重均呈显著负相关。Zhu 等^[24], Li 等^[25]对金定鸭和高邮鸭进行研究, 发现 *MyoD* 基因表达水平在腿肌中的相关性比在胸

肌中的相关性强, 而且与腿肌重呈显著负相关, 与胸肌重呈不显著相关。本研究结果表明 *MyoD* 基因的表达量与胸肌重呈显著负相关, 与腿肌重的相关性不显著。本研究结果与以上研究结果有所差异, 这可能与物种之间的差异^[26]和 *MyoD* 基因在皖南三黄鸡胸肌和腿肌中的表达模式不一致有关。

综上, *MyoD* 基因在皖南三黄鸡胸肌、腿肌不同日龄中的表达分析研究结果显示, *MyoD* 基因在肌肉发育中起着重要的作用, 该基因可能是影响鸡肌肉生长发育的重要候选基因, 为深入研究 *MyoD* 基因对皖南三黄鸡肌肉发育的调控作用提供了重要的参考依据。

参考文献:

- [1] HECKER L, JAGIRDAR R, JIN T, et al. Reversible differentiation of myofibroblasts by MyoD[J]. *Exp Cell Res*, 2011, 317(13): 1914-1921.
- [2] YIN H D, LI D Y, WANG Y, et al. Myogenic regulatory factor (MRF) expression is affected by exercise in postnatal chicken skeletal muscles[J]. *Gene*, 2015, 561(2): 292-299.
- [3] 范红英, 陈圆, 曾凤群, 等. 不同日龄惠阳胡须鸡肌肉中 IGF1、MyoD 基因表达研究[J]. *惠州学院学报*, 2017, 37(3): 61-64.
- [4] 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.
- [5] HIRAI H, TAIN T, KIKYO N. Structure and functions of powerful transactivators: VP16, MyoD and FoxA[J]. *Int J Dev Biol*, 2010, 54(11/12): 1589-1596.
- [6] YAMAMOTO M, LEGENDRE N P, BISWAS A A, et al. Loss of MyoD and Myf5 in skeletal muscle stem cells results in altered myogenic programming and failed regeneration[J]. *Stem Cell Rep*, 2018, 10(3): 956-969.
- [7] LI H F, SHU J T, SHAN Y J, et al. Myofiber development during embryonic to neonatal development in duck breeds differing in muscle growth rates[J]. *J Integr Agric*, 2016, 15(2): 403-413.
- [8] LEE E A, KIM J M, LIM K S, et al. Effects of variation in Porcine MYOD1 gene on muscle fiber characteristics, lean meat production, and meat quality traits[J]. *Meat Sci*, 2012, 92(1): 36-43.
- [9] VERNER J, HUMPOLÍČEK P, KNOLL A. Impact of MYOD family genes on pork traits in large white and Landrace pigs[J]. *J Anim Breed Genet*, 2007, 124(2): 81-85.
- [10] 李俊营, 詹凯, 刘伟, 等. 安徽省 3 个地方鸡品种的遗传多样性分析 [J]. *家畜生态学报*, 2011, 32(1): 20-3.
- [11] 朱春红, 徐文娟, 陈文峰, 等. 高邮鸭和金定鸭发育早期骨骼肌 MyoG 和 Myf 6 基因的表达分析[J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2013, 41(12): 14-20.
- [12] 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 Dev*, 2013, 35(4): 349-355.

- [13] 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.
- [14] LUO W, LI E, NIE Q, et al. Myomaker, regulated by MYOD, MYOG and miR-140-3p, promotes chicken myoblast Fusion[J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(11): 26186-26201.
- [15] SINGH K, CASSANO M, PLANET E, et al. A KAP1 phosphorylation switch controls MyoD function during skeletal muscle differentiation[J]. *Genes Dev*, 2015, 29(5): 513-525.
- [16] KIM S W, LEE J H, PARK B C, et al. Myotube differentiation in clustered regularly interspaced short palindromic repeat/Cas9-mediated MyoD knockout quail myoblast cells[J]. *Asian-Australas J Anim Sci*, 2017, 30(7): 1029-1036.
- [17] HIRAI H, VERMA M, WATANABE S, et al. MyoD regulates apoptosis of myoblasts through microRNA-mediated down-regulation of Pax3[J]. *J Cell Biol*, 2010, 191(2): 347-365.
- [18] ROPKA-MOLIK K, ECKERT R, PIÓRKOWSKA K. The expression pattern of myogenic regulatory factors MyoD, Myf6 and Pax7 in postnatal Porcine skeletal muscles[J]. *Gene Expr Patterns*, 2011, 11(1/2): 79-83.
- [19] LIU C, MCFARLAND D C, VELLEMAN S G. Effect of genetic selection on MyoD and myogenin expression in turkeys with different growth rates[J]. *Poult Sci*, 2005, 84(3): 376-384.
- [20] ZHANG R, LI R, ZHI L, et al. Expression profiles and associations of muscle regulatory factor (MRF) genes with growth traits in Tibetan chickens[J]. *Br Poult Sci*, 2018, 59(1): 63-67.
- [21] 刘宏祥, 胡艳, 单艳菊, 等. 鸭胚胎发育早期 MyoD 和 MSTN 的表达变化规律[J]. *东北农业大学学报*, 2015, 46(6): 79-85.
- [22] 王珍. 优质鸡 HS1 系生长发育规律及骨骼肌生长相关基因的表达研究[D]. 雅安:四川农业大学, 2015: 42-44.
- [23] BRUNE R M, BARD J B, DUBREUIL C, et al. A three-dimensional model of the mouse at embryonic day 9[J]. *Dev Biol*, 1999, 216(2): 457-68.
- [24] ZHU C H, GI G, TAO Z Y, et al. Development of skeletal muscle and expression of myogenic regulatory factors during embryonic development in Jinding ducks (*Anas platyrhynchos domestica*)₁₂[J]. *Poult Sci*, 2014, 93(5): 1211-1216.
- [25] LI H, ZHU C, TAO Z, et al. MyoD and Myf6 gene expression patterns in skeletal muscle during embryonic and posthatch development in the domestic duck (*Anas platyrhynchos domestica*)[J]. *J Anim Breed Genet*, 2014, 131(3):194-201.
- [26] MU C, FAN H. The mRNA expression pattern of skeletal muscle regulatory factors in divergent phenotype swine breeds [J]. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 2012, 18(4):685-690.