

李晓鸣, 王健, 赵孟丽, 等. 灰羽与白羽右江鹅羽色转录组差异初探 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (12): 1-9.

LI X M, WANG J, ZHAO M L, et al. Analysis of differences in transcriptome profile and growth between grey and white plumage Youjiang geese [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (12): 1-9.

## 灰羽与白羽右江鹅羽色转录组差异初探

李晓鸣<sup>1,2,3</sup>, 王健<sup>2,3</sup>, 赵孟丽<sup>2,3</sup>, 张蕾<sup>2</sup>, 孙国波<sup>2</sup>, 张干生<sup>2</sup>, 陈超<sup>3</sup>, 陈国顺<sup>1\*</sup>

(1. 甘肃农业大学, 甘肃 兰州 730070;

2. 江苏农牧科技职业学院, 江苏 泰州 225300;

3. 国家水禽基因库, 江苏 泰州 225300)

**摘要:** 旨在探索广西特有的优良地方品种右江鹅白羽和灰羽颜色的分子机制。试验采用转录组测序 (RNA-seq) 技术比较白羽和灰羽右江鹅的毛囊组织转录组差异, 通过 DESeq2 软件分析两组样品的基因表达差异, 使用 clusterProfiler R 软件包进行基因本体 (GO) 功能注释和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析。结果: 共有 275 个基因在白羽和灰羽组中差异表达, 候选基因包括酪氨酸酶相关蛋白 1 (TYRP1)、酪氨酸酶 (TYR)、瞬时受体电位阳离子通道亚家族 M 成员 1 (TRPM1)、转化生长因子  $\beta$  受体 2 (TGFB2)、性别决定区域 Y 盒蛋白 5 基因 (SOX5)、磷脂酶 C $\beta$ 2 (PLCB2)、黑素亲和素 (MLPH)、黑色素 A (MLANA)、谷胱甘肽过氧化物酶 3 (GPX3) 和 B 型内皮素受体 2 (EDNRB2); GO 分析显示差异基因主要富集于 G 蛋白偶联受体信号通路、生长相关通路以及有机磷分解代谢过程; KEGG 分析表明, 差异基因主要集中在过氧化物酶体增殖物激活受体 (PPAR) 信号通路、甘油脂质代谢和谷胱甘肽代谢等通路。试验结果为进一步研究基于羽色筛选右江鹅遗传选育提供一定的理论支持。

**关键词:** 转录组测序技术; 灰羽; 白羽; 右江鹅; 生长差异

**中图分类号:** S835 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-5130(2024)12-0001-09

## Analysis of differences in transcriptome profile and growth between grey and white plumage Youjiang geese

LI Xiaoming<sup>1,2,3</sup>, WANG Jian<sup>2,3</sup>, ZHAO Mengli<sup>2,3</sup>, ZHANG Lei<sup>2</sup>, SUN Guobo<sup>2</sup>,

ZHANG Gansheng<sup>2</sup>, CHEN Chao<sup>3</sup>, CHEN Guoshun<sup>1\*</sup>

(1. Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China;

2. Jiangsu Agri-animal Husbandry Vocational College, Taizhou 225300, China;

3. National Gene Bank of Waterfowl Resources, Taizhou 225300, China)

**Abstract:** The aim of this study was to explore the potential molecular mechanism underlying the different plumage colors (white and gray) of Youjiang geese, an excellent local species endemic to Guangxi Province. The experiment used transcriptome sequencing (RNA-seq) technology to collect and compare the transcriptome differences in the hair follicles of white- and gray-feathered Youjiang geese. The analysis of differential expressions in both groups was conducted using the DESeq2 R package. The clusterProfiler R package was used to test the statistical enrichment of DEGs in KEGG pathways and GO terms. The results showed that a total of 275 genes were differentially expressed in the white and grey feathered groups, and the candidate genes included TYRP1, TYR, TRPM1, TGFB2, SOX5, PLCB2, MLPH, MLANA, GPX3 and EDNRB2. The GO functional analysis revealed that GO terms were mainly involved in the G-protein coupled receptor signaling pathway term, growth term, and organophosphate catabolic process term. The KEGG pathway enrichment analysis showed that the differential genes were mainly concentrated in the PPAR signaling pathway, glycerolipid metabolism, and glutathione metabolism. This study provides preliminary ideas and theoretical support for further research on the genetic breeding of Youjiang geese based on their different plumage colors.

**Keywords:** RNA-seq; grey plumage; white plumage; Youjiang goose; growth difference

收稿日期: 2024-01-23; 修回日期: 2024-10-19

基金项目: 江苏农牧科技职业学院校级科研项目 (NSF2020CB19); 江苏省种业振兴“揭榜挂帅”项目 (JBGS [2021] 030)

第一作者: 李晓鸣, 男, 硕士, 讲师

\* 通信作者: 陈国顺, 教授, 研究方向为动物营养与饲料科学, E-mail: chengs@gsau.edu.cn。

羽毛是家禽重要的皮肤附属物，羽色在禽类求偶繁育、躲避捕食、热量调节、光保护及保护身体等方面均发挥重要作用<sup>[1]</sup>。在家禽繁殖育种方面，羽色既是表型标志物又是重要的经济性状，羽色的遗传稳定性直接影响了品种选育、推广及商业化进程。鹅羽色由羽毛中真黑色素和褐黑色素的分布、含量和比例所决定，有黑、白、棕、灰等颜色，且具不同条纹和斑点<sup>[2]</sup>。

真黑色素是一种高度异质性的聚合物，由 5, 6-二羟基吲哚 (DHI) 和 5, 6-二羟基吲哚-2-羧酸 (DHICA) 衍生的单元组成，使羽毛呈现黑色、灰色和棕色<sup>[3]</sup>。真黑色素的形成是一个极为复杂的过程，目前在哺乳动物和鱼类中发现超过 650 个基因与之相关，通过多种复杂机制共同调节皮肤和毛发的颜色变化，涉及多种细胞功能<sup>[4]</sup>。当前研究较多的基因有酪氨酸酶 (TYR)、黑色素前体蛋白 17 (PMEL17)、溶质载体家族 45 成员 2 (SLC45A2) 和黑素皮质素受体 1 (MC1R) 等<sup>[5-6]</sup>。此外，研究发现多种信号通路参与调控羽毛生长和色素沉着，如分泌型糖蛋白/ $\beta$ -链蛋白通路、活性氧/丝裂原活化蛋白激酶通路、干细胞因子/酪氨酸激酶受体通路、cAMP 应答元件结合蛋白/小眼相关转录因子/酪氨酸酶信号途径、转化生长因子  $\beta$ /Smads 蛋白家族途径和环磷酸腺苷/蛋白激酶 A 通路等<sup>[7-8]</sup>。

右江鹅产于广西壮族自治区百色市右江区，是右江河谷独特的环境气候下形成的地区性品种，具有强适应性和抗病力，性情温顺易饲，肉质细嫩，味道鲜美等特点，是广西地方优良畜禽品种之一<sup>[9]</sup>。右江鹅的羽色表型为白色和灰色两种，在水禽产业中，纯白的羽毛及羽绒具有更高的商业价值。研究发现不同羽色在生产性能及免疫方面也存在一定差异。黑色素沉着与内寄生虫抗性、体液免疫反应、细胞免疫和氧化应激抵抗力等免疫性密切相关<sup>[10-11]</sup>。目前，对鹅的遗传育种更多集中在繁殖性能上，对于羽色的遗传机制探索研究不多，尚未见对右江鹅羽色遗传机制的研究。为更好地挖掘右江鹅羽色的遗传机制，本研究通过转录组测序 (RNA-seq) 技术，对灰羽、白羽右江鹅皮肤毛囊样品进行转录组数据分析，挖掘差异表达基因并进行基因本体 (GO) 功能和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路生物信息学分析，初探不同羽色右江鹅决定羽毛颜色关键候选基因与信号通路，为后续右江鹅选育提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验动物及样品采集

10 只 180 日龄同一来源 (同批孵化、同批出雏、

同一环境) 的健康右江鹅购于国家水禽资源基因库 (中国江苏)，白羽组 5 只编号为 W1~W5，灰羽组 5 只编号为 G1~G5。通过翅静脉采血，常规离心获得血清，保存于 -20 °C。按照国家实验动物处理行为准则进行宰杀，宰杀后立即采集皮肤毛囊、腿肌和胸肌组织，用无菌生理盐水冲洗去血迹并擦干，放入液氮快速冷冻，随后移至 -80 °C 冰箱保存。

### 1.2 主要试剂和仪器

TRIzol 试剂购自 Invitrogen 公司 (美国)，总 RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒、荧光定量试剂盒均购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。荧光定量引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。NanoPhotometer<sup>®</sup> 分光光度计购于 IMPLEN 公司，Qubit<sup>®</sup> 2.0 荧光计购于 Thermo Scientific 公司，Agilent 2100 生物分析仪购于 Agilent 公司，荧光定量 PCR 仪 7500 购于 Applied Biosystems 公司。

### 1.3 总 RNA 提取及转录组测序

采用 TRIzol 法提取总 RNA，分别使用 NanoPhotometer<sup>®</sup> 分光光度计和 Qubit<sup>®</sup> 2.0 荧光计检测 RNA 样品浓度，Agilent 2100 生物分析仪检测 RNA 完整性，1% 琼脂糖凝胶检测 RNA 是否有降解或杂质。检测合格后的总 RNA 送至北京诺禾致源科技股份有限公司进行 Illumina 高通量测序分析。

### 1.4 原始数据过滤及质控分析

过滤原始数据中含有测序接头、无法确定碱基信息及测序质量较低的 reads 以获得有效数据，分别计算 Q30 值及 GC 含量百分比，评估测序质量，随后的差异表达分析及富集分析均基于过滤后的有效数据。通过 HISAT2 软件进行序列比对，并定位至参考基因组。

### 1.5 基因差异表达及富集分析

对有效数据使用 DESeq2 R 软件包 (1.16.1) 分析两组中基因差异表达。使用 Benjamini-Hochberg 方法对所得的  $P$  值进行调整。得到检测基因的参考差异倍数 (fold change 值, FC 值)，以  $|\log_2 FC| \geq 1$  且调整后的  $P$  值  $\leq 0.05$  为显著差异表达的阈值，GO 和 KEGG 数据库对差异表达基因进行功能注释和通路富集分析。clusterProfiler R 软件包用于检测富集的 GO 功能注释及 KEGG 通路是否具有统计学差异。

### 1.6 荧光定量 PCR (RT-qPCR) 验证

在 1.5 中获得的差异表达基因中随机选择 10 个，分别为长链脂肪酰辅酶 A 合成酶 1 (ACSL1)、膜联蛋白 A1 (ANXA1)、纤维蛋白原样蛋白 2 (FGL2)、G0/G1 开关基因 2 (G0S2)、脂蛋白脂酶 (LPL)、谷胱甘肽过氧化物酶 4 (GPX4)、脂滴包被蛋白 (PLIN1)、脂肪甘油三酯脂酶 (PNPLA2)、RAS 样

家族 11 成员 A (RASL11A)、Rhopilin rho GTP 酶结合蛋白 1 (RHPN1)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH), 引物设计如表 1, 反转录获得右江鹅皮肤组织样品的 cDNA 为模板, 进行 RT-qPCR 检测, 反应条件如下: 95 °C 预变性 10 min; 95 °C 10 s, 60 °C 40 s, 95 °C 15 s, 共 40 个循环; 熔解曲线 60 °C 60 s, 95 °C 30 s 及 60 °C 15 s。以 GAPDH 为内

参基因, 采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算上述基因的相对表达量, 以验证其表达规律是否与转录组测序一致。

### 1.7 数据统计与分析

应用 GraphPad Prism 8 进行两组数据间的  $t$  检验分析, 以及 RT-qPCR 与 RNA-seq 结果相关性分析, 数据以“平均值±标准差”表示,  $P < 0.05$  为差异显著,  $P < 0.01$  为差异极显著。

表 1 RT-qPCR 验证引物信息

引物名称	引物序列 (5'→3')	产物长度/bp	引物名称	引物序列 (5'→3')	产物长度/bp
ACSL1-F	GGAACCTTTTGGCACAGA	122	PLIN1-F	ACCCGCTGTCCTTCCTG	198
ACSL1-R	CTGGCTTTGGAGGCATAG		PLIN1-R	GGCTGTAGAGGTTGGCGTA	
ANXA1-F	CCATCATTTGCCATCTTGAC	184	PNPLA2-F	CGAAAGAAGCACGGAAGA	143
ANXA1-R	GCCCTTAATTCTTCAGCATC		PNPLA2-R	CCGCCTGAGGGAATAC	
FGL2-F	TGGGTAAAAGCAAAGTGGAA	101	RASL11A-F	GACTACGAGCCCAACACC	181
FGL2-R	ATGATGAAAAGGACATTGAGC		RASL11A-R	TCGAGTAGACCACGAGGAA	
GOS2-F	ACACGAGGGCAAATGCT	120	RHPN1-F	GGCTTTGGGTTTCAGGCT	125
GOS2-R	GCTGTGGGGCTCTTAGG		RHPN1-R	CAGTCCTTGC CGCTCAC	
GPX4-F	GCTTTCCCTGCAACCACT	157	GAPDH-F	TGGCATCCAAGGAGTAAGC	72
GPX4-R	GGCTGCTCCTTCATCCA		GAPDH-R	GGGCTCCAACAAAGGCT	
LPL-F	ACATTGCTTTCACATTGCC	198			
LPL-R	TTTTCTGAGTTTCGCCTGA				

## 2 结果

### 2.1 不同羽色右江鹅皮肤组织转录组分析与验证

在自然选择的情况下, 右江鹅主要分为白鹅和灰鹅两种, 两者体型均为船形, 背宽胸广, 腹部下垂,

头部肉瘤较小, 咽喉无咽袋。灰鹅的头部、背部和尾部呈灰棕条纹, 颈部和腹部呈白色, 嘴为黑棕色, 脚蹼为橘红色, 头顶、背部和尾部的灰棕色羽毛的从羽片顶端至羽根处颜色为灰棕色至白色渐变 (图 1A)。白鹅全身羽毛洁白, 嘴和脚蹼为橘红色 (图 1B)。

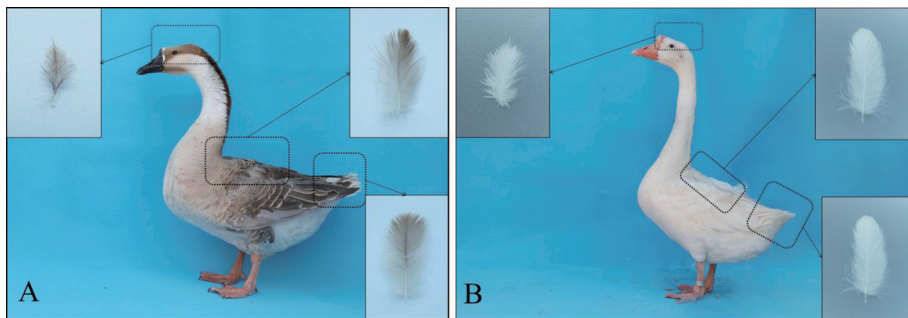


图 1 灰羽 (A) 和白羽 (B) 右江鹅外观及头顶、背部、尾部羽毛特写

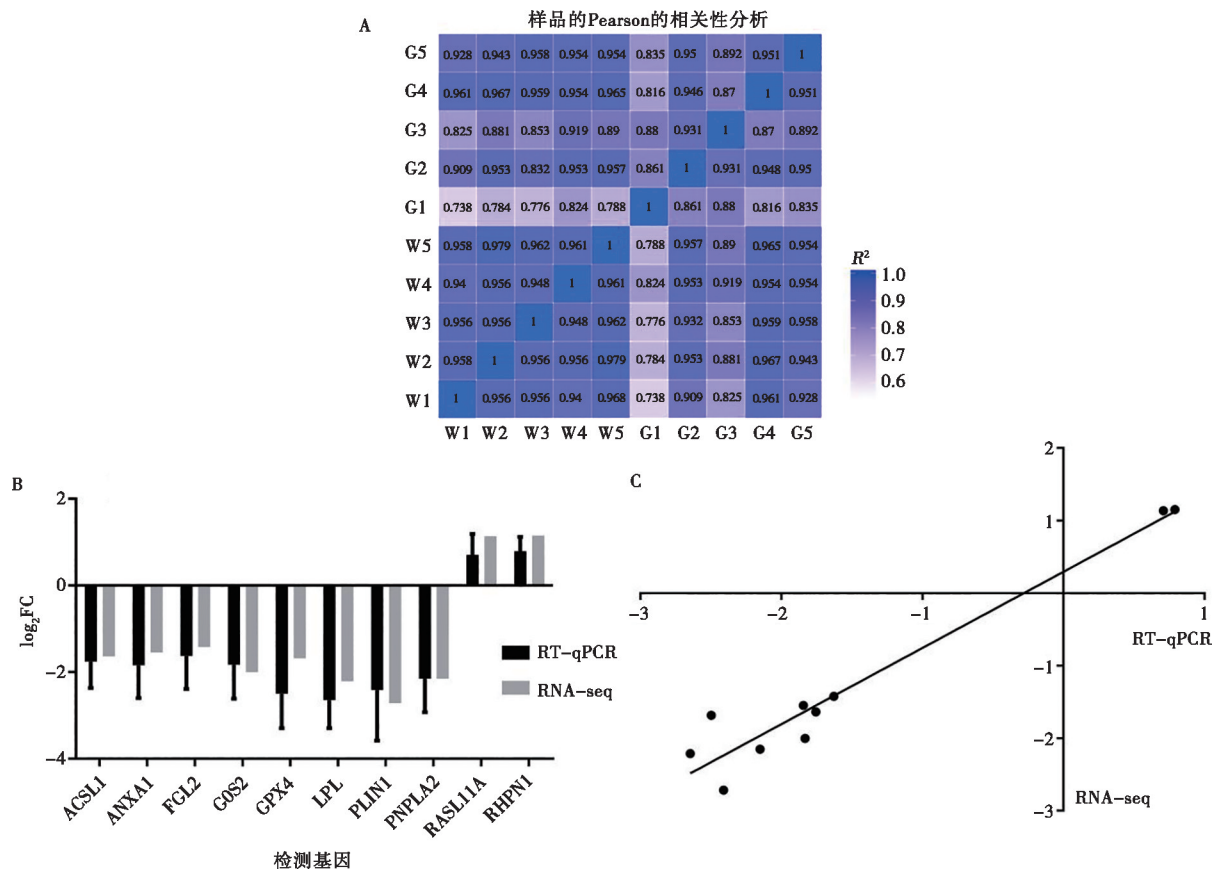
从灰羽和白羽右江鹅毛囊组织中提取总 RNA, 共构建 10 个 cDNA 文库, 通过 Illumina 高通量平台测序得到原始数据。过滤后, 每个样品的有效数据量均超过  $4.2 \times 10^7$  条, 有效数据的 Q30 值均大于 92.51%, GC 含量约为 50% (表 2), 说明转录组文库构建质量较好。样本有效数据映射至鹅参考基因组的比率均大于 72.16% (<ftp://ftp.ensembl.org/pub/release-101/>

[fasta/anser\\_cygnoides/](fasta/anser_cygnoides/))。试验原始数据已提交 NCBI 数据库 (SUB8314337)。通过皮尔逊相关分析发现每组的  $R^2$  值均大于 0.81 (图 2A), 表明组内样品重复性好。随机挑选的 10 个基因进行 RT-qPCR 验证, 结果显示所有基因的 RT-qPCR 表达趋势与转录组结果一致, 以上验证了 RNA-seq 结果的准确性和可靠性 (图 2B 和 C)。

表 2 样本转录组数据质量分析

组别	样品编号	原始数据/条	总映射数/条	有效数据*/条	Q30 值/%	GC 含量/%	总映射数比/%
灰羽	G1	48 095 876	47 019 214	35 323 833	92.59	52.2	75.13
	G2	60 617 412	59 489 896	44 480 115	92.9	51.6	74.77
	G3	43 547 754	42 610 984	32 237 391	92.51	50.37	75.66
	G4	66 988 494	65 658 674	48 936 262	93.13	52.12	74.53
	G5	56 616 216	55 671 626	42 832 998	93.1	51.84	76.94
白羽	W1	62 323 884	61 305 834	44 237 565	92.7	53.2	72.16
	W2	65 209 610	63 977 948	47 414 999	92.55	52.46	74.11
	W3	58 380 348	57 401 308	43 302 304	92.76	52.05	75.44
	W4	53 674 442	52 464 154	39 168 305	93.08	51.03	74.66
	W5	53 121 874	52 203 112	38 940 031	92.53	52.09	74.59

注：\*有效数据为删除原始数据中含有适配器、poly-N 和低质量的数据。



A. 两组的皮尔逊相关性; B. 差异表达基因 RT-qPCR 验证; C. 随机选择的验证基因 RT-qPCR 结果和 RNA-seq 结果之间的相关系数:  $x$  轴表示通过 RT-qPCR 确定的表达的  $\log_2FC$ ,  $y$  轴表示通过 RNA-seq 确定的表达中的  $\log_2FC$ 。

图 2 转录组数据验证与相关性分析

## 2.2 差异表达基因及功能富集分析

两组不同羽色的皮肤组织样品转录组分析结果如图 3。聚类分析结果 (图 3A) 表明每组样品具有良好的重复性。两组共表达基因有 12 643 个, 灰羽组中有 422 个特异表达基因, 而白羽组有 391 个基因特异性表达。火山图 (图 3B) 显示白羽组相较于灰羽

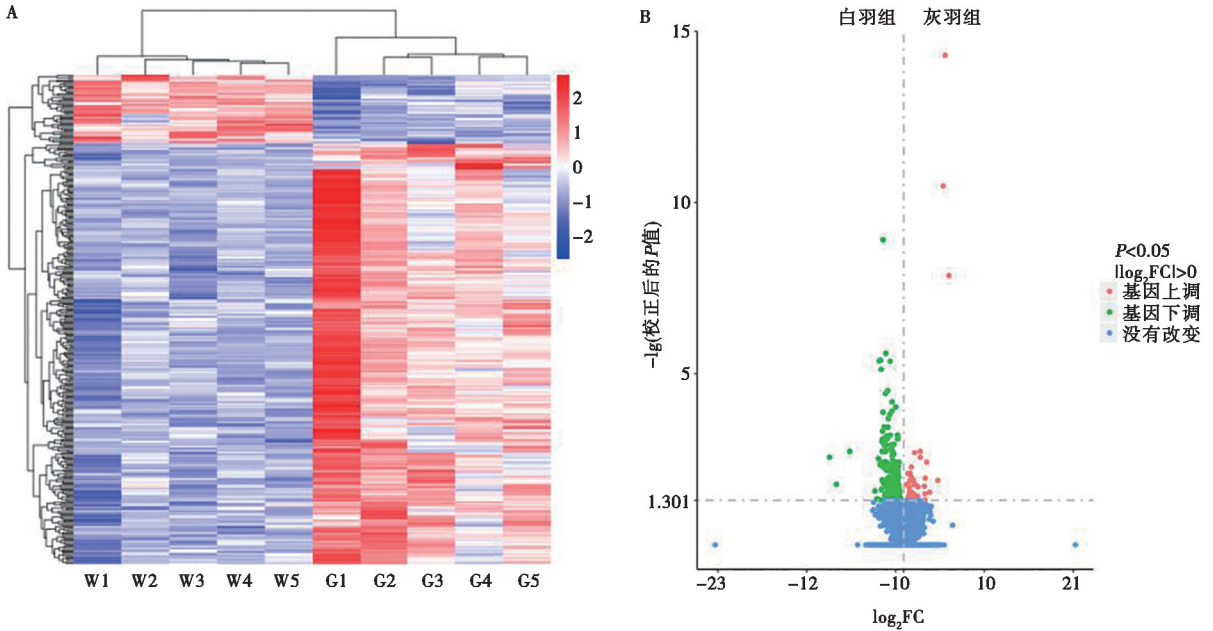
组, 共有 45 个基因表达显著上升, 有 275 个基因表达显著下降, 有 20 048 个基因没有改变。

对已获得的右江鹅不同羽色表型的差异表达基因进行基因功能富集和 KEGG 通路富集, 发现共富集了 318 个 GO 条目 (图 4A、B), 其中, G 蛋白偶联受体信号通路条目、生长条目及有机磷分解代谢过程

条目均有显著富集；KEGG 显著富集途径分别为过氧化物酶体增殖激活受体 (PPAR) 信号通路、甘油酯代谢、谷胱甘肽代谢、局灶性黏附、神经活性配体-受体相互作用、药物代谢-细胞色素 P450、铁死亡和胆固醇代谢 (图 4C、D)。

结合富集结果对差异表达基因进行进一步梳理,发现如 TYR、TYRP1、瞬时受体电位阳离子通道亚家族 M 成员 1 (TRPM1)、转化生长因子  $\beta$  受体 2

(TGFB2)、性别决定区域 Y 盒蛋白 5 基因 (SOX5)、磷脂酶 C $\beta$ 2 (PLCB2)、黑素亲和素 (MLPH)、黑色素 A (MLANA)、谷胱甘肽过氧化物酶 3 (GPX3) 和 B 型内皮素受体 2 (EDNRB2) 多种羽色合成相关基因存有差异性表达 (表 3),本研究首次发现 SOX5 和 PLCB2 在在白羽与灰羽组中差异表达,为探索不同羽色右江鹅的遗传育种提供一定的方向。



A. 白羽组和灰羽组数据的聚类分析; B. 白羽与灰羽组差异表达基因的火山图。

图 3 转录组结果分析

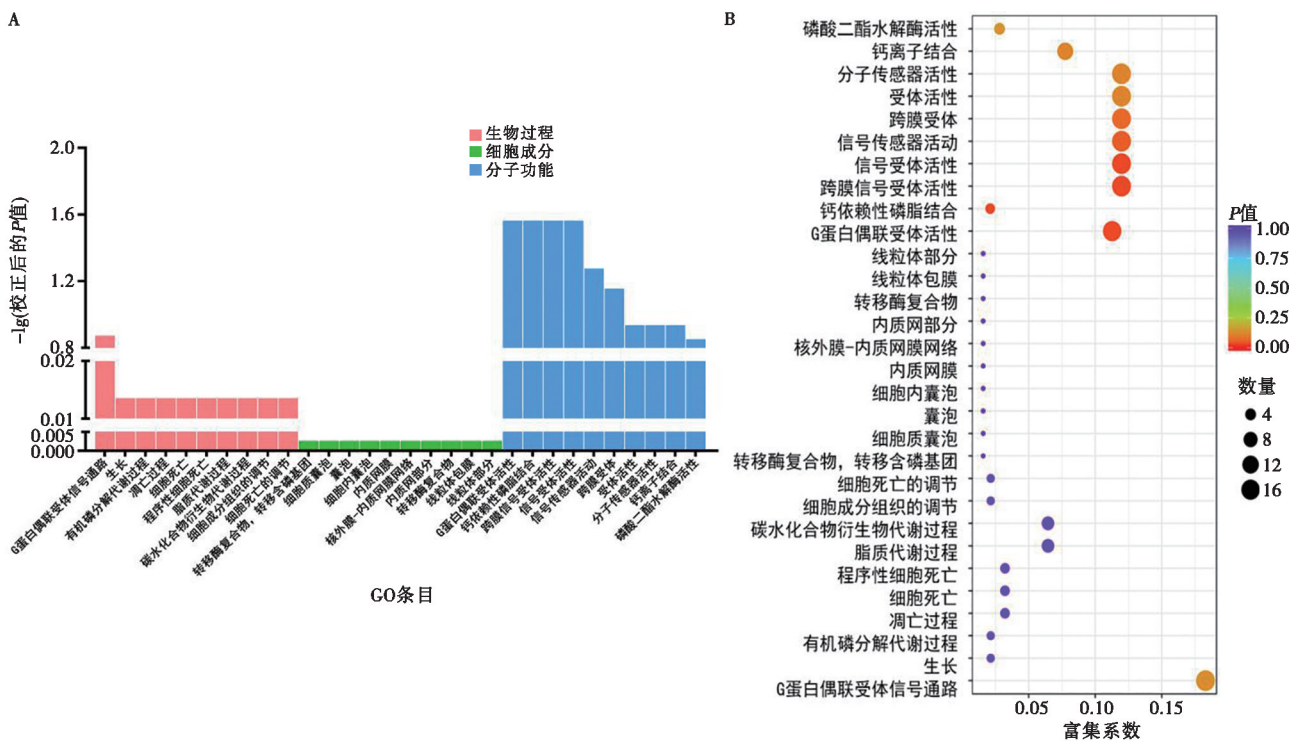
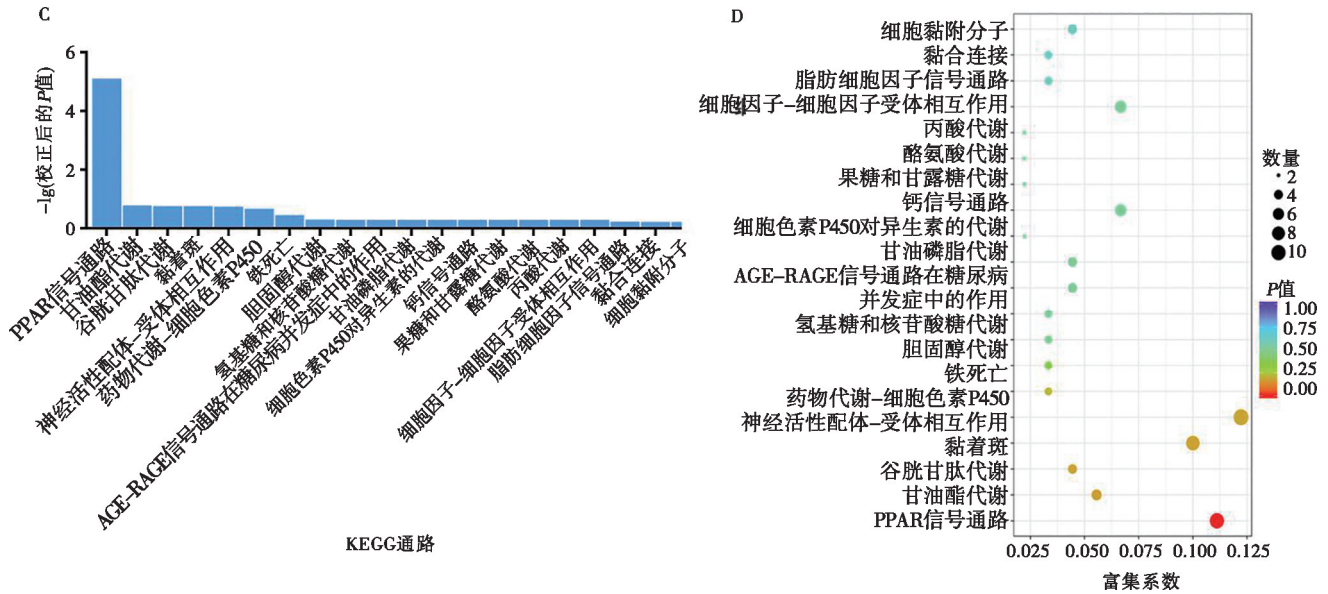


图 4 GO 富集分析结果



A. 显著富集 GO 条目; B. 前 30 显著丰富的 GO 条目; C. 前 20 显著富集的 KEGG 通路; D. 前 20 显著富集的 KEGG 途径。

图 4 GO 富集及 KEGG 富集分析

表 3 显著变化的黑色素表达相关基因

基因名称	白羽组	灰羽组	$\log_2\text{FC}$	调整后的 $P$ 值	涉及功能
TYRP1	0	58.77	-8.333 34	0.016 980	黑色素合成
TYR	0.39	41.74	-6.687 77	0.001 853	黑色素合成
TRPM1	36.93	122.83	-1.736 72	0.017 477	黑色素合成
TGFBR2	925.07	1 604.46	-0.793 95	0.032 753	黑色素细胞特化与发育
SOX5	69.52	144.83	-1.056 05	0.013 894	黑色素细胞特化与发育; 黑色素合成
PLCB2	342.17	648.57	-0.921 35	0.026 419	可能黑色素颗粒形成与迁移
MLPH	52.323 46	123.156 3	-1.230 99	0.002 201	黑色素转运
MLANA	0	107.587 9	-9.205 19	0.002 765	黑色素小体合成
GPX3	3 625.143	8 398.295	-1.212 05	0.016 644	黑色素合成
EDNRB2	27.907 2	194.295 1	-2.799 78	0.000 074	黑色素细胞的增殖、分化与迁移

### 3 讨论

右江鹅是中国广西的一种优质地方品种鹅，具有肉质细嫩鲜美及抗病性强等优势，自然条件下表现为白羽和灰羽<sup>[9]</sup>。羽毛是鹅重要的皮肤附属物。它既能发挥飞行、调节体温和保护躯体的作用，同时是极具经济价值的商品原料。成年鸟类的黑色素细胞主要存在于羽毛毛囊和表皮中，其特有黑色素小体产生真黑色素（黑色）和褐黑色素（黄色至红色），共同组成鸟类皮肤和羽毛的斑斓色彩。Baxter 等<sup>[4]</sup>系统性归纳了基因与色素表型的关系，发现了数百个与色素表型相关的基因。禽类羽色是遗传和环境效应相互影响后的产物，表型变化非常复杂，主要影响因素可以归纳为以下 4 大类：黑色素细胞的特化与发育，黑色素

小体的组成、合成调节、转运，黑色素的合成，成熟黑色素转运至黑色素细胞树突和角质细胞<sup>[12]</sup>。

黑色素细胞的分化、迁移、增殖、存活等一系列生理生化过程，受到复杂基因网络在时空上的有序调控，其中任一环节的改变，都可能对鹅羽色表型产生影响。本研究发现，EDNRB2、TGFBR2 和 SOX5 可能参与了右江鹅黑色素细胞发育与特化，产生灰白两种羽色。内皮素受体（EDNR）是一类 G 蛋白偶联受体，家族中共有 3 个同源异构体 A、B 和 C。在黑色素细胞中，内皮素 3（EDN3）与受体 EDNRB 相互作用，调节黑色素细胞的增殖分化，EDNRB 基因突变会导致斑点性状。禽类不同于真兽亚目纲，它具有一种旁系同源基因 EDNRB2，其是研究禽类羽色调控机制的热点基因之一。研究发现 EDNRB2 通过抑制黑

色素细胞在胚胎期间黑色素细胞向其他躯干部位的迁移<sup>[13]</sup>，导致身体部分或整体黑色素沉积的缺失，外观上呈现熊猫羽色（鹌鹑）<sup>[14]</sup>或者黑色斑纹（鸭）。EDNRB2在鹅羽色变化的报道较少，仅Ren等<sup>[15]</sup>报道EDNRB2在灰羽鹅组中表达显著高于白羽鹅，本研究中也呈现相似变化，进一步说明EDNRB2可能为鹅羽色调控的重要候选研究基因。黑色素细胞的发育分化也受多种信号通路的调控。TGFBR2是转化生长因子 $\beta$ （TGF $\beta$ ）的重要受体，TGF $\beta$ 信号通路在黑色素细胞分化及维持毛囊内黑色素干细胞均发挥重要作用。角质细胞或间充质干细胞分泌TGF $\beta$ 作用于黑色素细胞，通过与转化生长因子 $\beta$ 受体1（TGFBR1）和TGFBR2的协同结合，激活Smads蛋白，抑制配对盒3（PAX3）和小眼相关转录因子（MITF）的表达，最终抑制黑色素的合成<sup>[16]</sup>。本研究RNA-seq结果显示，TGFBR2在灰羽组中表达显著高于白羽组，这一结果可能与TGF $\beta$ /Smads通路在毛囊形成后，维持毛囊膨大区黑色素干细胞，持续向毛母质提供黑色素细胞密切相关<sup>[17]</sup>。同时，灰羽组表达升高的转录因子SOX5参与了黑色素细胞发育及黑色素合成过程。SOX5属于一类拥有一个或多个高迁移率组转录因子的基因家族，2002年Kuroiwa等<sup>[18]</sup>报道SOX5基因位于鸡染色体1的p1.6→p1.4上，其在人类和家鸡上都高度保守。全基因组检测发现SOX5是形成淡紫色的候选调控基因。SOX5可通过调节牡蛎转录因子SOX10的活性<sup>[19]</sup>，在黑色素细胞中发挥调控作用，并在青鲮鱼色素细胞发育中起着命运开关的作用<sup>[20]</sup>。针对不同毛色的小鼠研究发现，不同表达水平SOX5对MITF具有上调<sup>[21]</sup>和抑制<sup>[22]</sup>的双向调节，进而影响黑色素的形成，同时也发现MITF-M对SOX5具有负调控作用，但本研究中未发现MITF在灰白羽色右江鹅中的转录表达变化。因此，SOX5对鹅羽变化的影响机制，尚需进一步探索研究。黑色素小体是生成黑色素细胞生成黑色素的特殊细胞结构，本研究发现MLANA在白羽组转录组表达为0，MLANA几乎只在产生黑色素的细胞中表达，编码构成黑素小体成熟所必需的结构蛋白<sup>[23]</sup>。研究者在鸡<sup>[24]</sup>及暗眼灯草鹑<sup>[25]</sup>的白羽或浅色羽个体中均观察到MLANA表达显著下调。siRNA-MLANA会引起未成熟黑色素小体形态异常，导致眼部白化病<sup>[26]</sup>。虽然白羽组的MLANA转录表达为0，但是白羽右江鹅的虹膜呈黑色，而非白化的红眼。因此，是否存在右江鹅白羽表型是否与MLANA表达密切相关，且MLANA在右江鹅不同组织中是否存在表达特异性，都有待深入探索。

黑色素合成的直接关键基因和间接涉及的信号通

路是目前关于羽色或被毛颜色调控研究最多也是最为成熟的部分。本文在灰羽组特异表达基因中发现多种研究较多的直接影响黑色素形成的基因，且相较于白羽组表达显著，如TYR、TYRP1、TRPM1和GPX3。TYR和TYRP1参与一系列从L-酪氨酸开始合成黑色素及真黑色素的反应<sup>[27]</sup>，酪氨酸是黑色素的前体氨基酸，在TYR基因编码的酪氨酸酶的作用下形成真黑色素，TYR突变可诱导稀释表型<sup>[28]</sup>或诱发白化病<sup>[29]</sup>。

TYRP1有助于TYRP复合物形成，TYRP1蛋白通过催化DHICA氧化为吡啶-5,6-醌-2-羧酸，在黑色素生物合成途径中发挥关键作用<sup>[27]</sup>。TYRP1启动子含有一个可以与小眼转录因子结合的区域，在黑色素细胞的激活色素沉着、细胞增殖及分化等方面发挥重要作用<sup>[30]</sup>。鸡的TYRP1基因发生的错义突变会改变黑色素小体数量和结构的变化使羽色呈巧克力色<sup>[31]</sup>。在黑羽鹌鹑中也观察到TYRP1表达显著低于栗色鹌鹑<sup>[32]</sup>。GPX3编码谷胱甘肽过氧化物酶3蛋白，是谷胱甘肽过氧化物酶家族的唯一细胞外谷胱甘肽过氧化物酶蛋白，催化谷胱甘肽还原有机氢过氧化物和过氧化氢，从而保护细胞免受氧化损伤<sup>[33]</sup>。与其他细胞内抗氧化酶不同，敲除GPX3不导致小鼠胚胎死亡，且正常饲养条件下GPX3<sup>-/-</sup>的C57BL/6小鼠表型与野生型一致<sup>[34]</sup>。Yu等<sup>[35]</sup>挖掘黑羽白羽乌骨鸡转录组测序结果，并结合已知GPX3可以催化谷胱甘肽形成谷胱甘肽二硫化物减少真黑色素和黑色素合成过程中产生的过氧化氢量<sup>[36-37]</sup>，发现GPX3可能是影响乌骨鸡羽毛黑色素沉着的候选基因之一<sup>[37]</sup>。本研究中也发现灰羽组中GPX3的表达要显著高于白羽组，且谷胱甘肽过氧化物酶家族另一成员谷胱甘肽过氧化物酶4（GPX4）在两组中表达差异显著。GPX4被认为是一种“兼职”蛋白，它有可能在成熟精子中发挥过氧化物酶和结构蛋白的双重功能<sup>[38]</sup>，我们推测GPX4可能是鹅羽黑色素沉着另一候选基因，有待进一步研究。

形成羽色及图案的最后一步是成熟黑色素的顺利转运。MLPH基因编码黑素亲和素，属于突触结合蛋白类似蛋白家族，与GTP结合蛋白（Rab27a）、肌球蛋白Va形成的三元复合物参与成熟黑色素的转运，其中任一蛋白功能缺失，直接影响黑色素小体沿微管从细胞核周聚集至黑色素细胞树突末梢，表现为被毛颜色的稀释。转录组结果显示Rab27a和肌球蛋白Va的转录水平未见显著差异，但MLPH在灰羽组高表达，显示其可能是限制转运三元复合蛋白数量的关键基因，黑色素转运的差异性可能是造成种群中自然形成两种羽色的因素之一，有待进一步探索研究。鸡的

MLPH 基因有 7 个 SNP 位点, 外显子上 c. 103C>T 导致 R35W 错义突变与淡紫羽色相关, 使真黑色素和褐黑色素被稀释为灰色和米黄色<sup>[39]</sup>。鸟类的 MLPH 基因高度保守, 提示其在不同鸟中具有相似的功能。与鸡稍有不同, 鹅 MLPH 基因具有 16 个外显子和 15 个内含子, 两个多态位点位于外显子 11 上均为错义突变, 仅表达在眼睛、背部、腹部和脚蹼皮肤<sup>[40]</sup>, 但对形成不同羽色的影响尚不明确。PLCB2 在调节羽色或被毛颜色方面的报道较少, 仅 Luo 等<sup>[41]</sup>对金背鲫两种不同颜色皮肤成因的研究中报道, PLCB2 可能影响黑色素颗粒的形成和移动, 本文报道了 PLCB2 在灰白羽鹅中的表达情况, 其是羽色调节的候选基因, 具体涉及的机制有待进一步探索。

综上, 本研究在灰白羽色右江鹅的转录组差异, 发现发生显著变化的基因主要集中在黑色素细胞的分化与发育, 黑色素小体生成转运, 黑色素合成及成熟黑色素转运等环节, 有研究较为深入的 TYR、TYRP1、TRPM1、MLANA 和 GPX3, 也有首次在鹅羽色表型比较中报道的 MLPH、PCLB2 和 SOX5。本研究为继续深入研究基于羽色筛选的右江鹅的遗传育种提供理论基础。

## 参考文献:

- [1] CUTHILL I C, ALLEN W L, ARBUCKLE K, et al. The biology of color [J]. *Science*, 2017, 357 (6350): eaan0221.
- [2] GLUCKMAN T L, MUNDY N I. Evolutionary pathways to convergence in plumage patterns [J]. *BMC Evol Biol*, 2016, 16 (1): 172.
- [3] ITO S, WAKAMATSU K. Quantitative analysis of eumelanin and pheomelanin in humans, mice, and other animals; a comparative review [J]. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2003, 16 (5): 523–531.
- [4] BAXTER L L, WATKINS-CHOW D E, PAVAN W J, et al. A curated gene list for expanding the horizons of pigmentation biology [J]. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2019, 32 (3): 348–358.
- [5] YANG C W, RAN J S, YU C L, et al. Polymorphism in MC1R, TYR and ASIP genes in different colored feather chickens [J]. *3 Biotech*, 2019, 9 (5): 203.
- [6] NIE C, BAN L, NING Z, et al. Feather colour affects the aggressive behaviour of chickens with the same genotype on the dominant white (I) locus [J]. *PLoS One*, 2019, 14 (5): e0215921.
- [7] XIE W Y, CHEN M J, JIANG S G, et al. The Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway is involved in regulating feather growth of embryonic chicks [J]. *Poult Sci*, 2020, 99 (5): 2315–2323.
- [8] 刘木星, 刘昕宇, 张海峰, 等. 稻瘟病菌侵染水稻早期作用机制的研究进展 [J]. *南京农业大学学报*, 2022, 45 (5): 916–928.
- [9] 韦进骏. 浅谈右江鹅的保种与开发 [J]. *广西畜牧兽医*, 2016, 32 (6): 292–294.
- [10] GASPARINI J, BIZE P, PIAULT R, et al. Strength and cost of an induced immune response are associated with a heritable melanin-based colour trait in female tawny owls [J]. *J Anim Ecol*, 2009, 78 (3): 608–616.
- [11] HENSCHEN A E, WHITTINGHAM L A, DUNN P O. Oxidative stress is related to both melanin- and carotenoid-based ornaments in the common yellowthroat [J]. *Funct Ecol*, 2016, 30 (5): 749–758.
- [12] CUI Y Z, MAN X Y. Biology of melanocytes in mammals [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2023, 11: 1309557.
- [13] PLA P, ALBERTI C, SOLOV' EVA O, et al. Ednrb2 orients cell migration towards the dorsolateral neural crest pathway and promotes melanocyte differentiation [J]. *Pigment Cell Res*, 2005, 18 (3): 181–187.
- [14] MIWA M, INOUE-MURAYAMA M, AOKI H, et al. Endothelin receptor B2 (EDNRB2) is associated with the panda plumage colour mutation in Japanese quail [J]. *Anim Genet*, 2007, 38 (2): 103–108.
- [15] REN S, LYU G, IRWIN D M, et al. Pooled sequencing analysis of geese (*Anser cygnoides*) reveals genomic variations associated with feather color [J]. *Front Genet*, 2021, 12: 650013.
- [16] LE L, SIRÉS-CAMPOS J, RAPOSO G, et al. Melanosome biogenesis in the pigmentation of mammalian skin [J]. *Integr Comp Biol*, 2021, 61 (4): 1517–1545.
- [17] NISHIMURA E K, SUZUKI M, IGRAS V, et al. Key roles for transforming growth factor beta in melanocyte stem cell maintenance [J]. *Cell Stem Cell*, 2010, 6 (2): 130–140.
- [18] KUROIWA A, UCHIKAWA M, KAMACHI Y, et al. Chromosome assignment of eight SOX family genes in chicken [J]. *Cytogenet Genome Res*, 2002, 98 (2/3): 189–193.
- [19] MIN Y, LI Q, YU H. Heme-peroxidase 2 modulated by POU2F1 and SOX5 is involved in pigmentation in pacific oyster (*Crassostrea gigas*) [J]. *Mar Biotechnol (NY)*, 2022, 24 (2): 263–275.
- [20] NAGAO Y, SUZUKI T, SHIMIZU A, et al. Sox5 functions as a fate switch in medaka pigment cell development [J]. *PLoS Genet*, 2014, 10 (4): e1004246.
- [21] 常露程, 赵兵令, 刘颖, 等. SOX5 影响小鼠皮肤黑色素细胞 MITF-M 表达和黑色素生成 [J]. *畜牧兽医学报*, 2018, 49 (1): 83–91.
- [22] KORDAß T, WEBER C E M, OSWALD M, et al. SOX5 is involved in balanced MITF regulation in human melanoma cells [J]. *BMC Med Genomics*, 2016, 9: 10.
- [23] MAZIÈRE A M D, MUEHLETHALER K, DONSELAAR E V, et al. The melanocytic protein Melan-A/MART-1 has a subcellular localization distinct from typical melanosomal proteins [J]. *Traffic*, 2002, 3 (9): 678–693.
- [24] ZHENG X, ZHANG B, ZHANG Y, et al. Transcriptome analysis of feather follicles reveals candidate genes and pathways associated with pheomelanin pigmentation in chickens [J]. *Sci Rep*, 2020, 10 (1): 12088.
- [25] ABOLINS-ABOLS M, KORNOBIS E, RIBECA P, et al. Differential gene regulation underlies variation in melanic plumage coloration in the dark-eyed junco (*Junco hyemalis*) [J]. *Mol Ecol*, 2018, 27 (22): 4501–4515.
- [26] GIORDANO F, BONETTI C B, SURACE E M, et al. The ocular al-

- binism type 1 (OAI) G-protein-coupled receptor functions with MART-1 at early stages of melanogenesis to control melanosome identity and composition [J]. *Hum Mol Genet*, 2009, 18 (23): 4530-4545.
- [27] RAY K, CHAKI M, SENGUPTA M. Tyrosinase and ocular diseases: some novel thoughts on the molecular basis of oculocutaneous albinism type 1 [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2007, 26 (4): 323-358.
- [28] LYONS L A, IMES D L, RAH H C, et al. Tyrosinase mutations associated with Siamese and Burmese patterns in the domestic cat (*Felis catus*) [J]. *Anim Genet*, 2005, 36 (2): 119-126.
- [29] DAMÉ M C F, XAVIER G M, OLIVEIRA-FILHO J P, et al. A nonsense mutation in the tyrosinase gene causes albinism in water buffalo [J]. *BMC Genet*, 2012, 13: 62.
- [30] WANG P, LI Y, HONG W, et al. The changes of microRNA expression profiles and tyrosinase related proteins in MITF knocked down melanocytes [J]. *Mol Biosyst*, 2012, 8 (11): 2924-2931.
- [31] LI J, BED'HOM B, MARTHEY S, et al. A missense mutation in TYRP1 causes the chocolate plumage color in chicken and alters melanosome structure [J]. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2019, 32 (3): 381-390.
- [32] XU Y, ZHANG X H, PANG Y Z. Association of tyrosinase (TYR) and tyrosinase-related protein 1 (TYRP1) with melanic plumage color in Korean quails (*Coturnix coturnix*) [J]. *Asian-Australas J Anim Sci*, 2013, 26 (11): 1518-1522.
- [33] BIERL C, VOETSCH B, JIN R C, et al. Determinants of human plasma glutathione peroxidase (GPx-3) expression [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279 (26): 26839-26845.
- [34] OLSON G E, WHITIN J C, HILL K E, et al. Extracellular glutathione peroxidase (Gpx3) binds specifically to basement membranes of mouse renal cortex tubule cells [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2010, 298 (5): 1244-1253.
- [35] YU S, WANG G, LIAO J, et al. Transcriptome profile analysis of mechanisms of black and white plumage determination in black-bone chicken [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 46 (6): 2373-2384.
- [36] MEYSKENS F L, FARMER P, FRUEHAUF J P. Redox regulation in human melanocytes and melanoma [J]. *Pigment Cell Res*, 2001, 14 (3): 148-154.
- [37] BENATHAN M. Opposite regulation of tyrosinase and glutathione peroxidase by intracellular thiols in human melanoma cells [J]. *Arch Dermatol Res*, 1997, 289 (6): 341-346.
- [38] WANG Q, ZHAN S, LIU Y, et al. Low-Se diet can affect sperm quality and testicular glutathione peroxidase 4 activity in rats [J]. *Biol Trace Elem Res*, 2021, 199 (10): 3752-3758.
- [39] VAEZ M, FOLLETT S A, BED'HOM B, et al. A single point-mutation within the melanophilin gene causes the lavender plumage colour dilution phenotype in the chicken [J]. *BMC Genet*, 2008, 9: 7.
- [40] 刘杰, 刘毅, 王翠, 等. 鹅 MLPH 基因分子克隆、组织表达及 SNP 检测 [J]. *中国家禽*, 2016, 38 (12): 4-9.
- [41] LUO M, ZHANG X, ZHU W, et al. Integrative analysis uncovers the mechanism underlying the environmental adaptation of an indigenous crucian carp (*Carassius auratus gibelio*) in Dong's Rice Fish Duck System [J]. *Aquaculture*, 2023, 573: 739586.