

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2026.52044

研究简报

水稻 SPX 基因家族鉴定及响应磷处理的表达分析

胡 赵^{1,3,*} 钱 润² 谢丰璞^{2,*} 应素平³

¹ 太原师范学院生物科学与技术学院, 山西晋中 030619; ² 沈阳药科大学中药学院, 辽宁沈阳 110016; ³ 南昌大学生命科学学院, 江西南昌 330031

摘 要: 本研究旨在全基因组水平系统鉴定水稻 SPX 基因家族成员, 分析其进化特征与表达模式, 为阐明该家族在磷信号转导中的功能提供理论依据。利用生物信息学方法对水稻 SPX 基因家族进行全基因组鉴定, 分析其理化性质、系统进化关系、基因结构、保守基序、启动子顺式作用元件及共线性关系; 基于转录组数据和实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 技术解析其组织表达特性及磷胁迫应答模式。本研究共鉴定到 6 个水稻 SPX 基因, 分布于 5 条染色体上。系统进化分析表明, *OsSPX1* 和 *OsSPX2* 以 100% 支持率聚类, *OsSPX3* 与 *OsSPX5/OsSPX6* 形成稳定亚簇。共线性分析发现, 有 2 对片段复制基因(*OsSPX1/OsSPX2* 和 *OsSPX5/OsSPX6*), 且 K_a/K_s 值均小于 1 (0.19~0.44), 表明该家族在进化过程中受强烈纯化选择。基因结构分析显示, *OsSPX* 成员含 2~3 个外显子, 保守基序分布模式与系统进化关系高度一致。启动子分析发现了 135 个顺式作用元件, 主要包括激素响应、光响应和胁迫响应元件, 其中茉莉酸甲酯和脱落酸响应元件最为丰富。基于 RT-qPCR 在 ShijinB 品种的表达模式分析表明, *OsSPX1* 至 *OsSPX6* 在根中均表现出显著表达优势, 具有普遍的根偏好性特征。此外, *OsSPX3* 在花序中也显示出较高的表达水平, 而 *OsSPX1* 和 *OsSPX4* 在叶中的表达也较高。磷胁迫响应分析显示, *OsSPX1*、*OsSPX2*、*OsSPX3*、*OsSPX5* 和 *OsSPX6* 在低磷条件下显著上调表达, 其中, *OsSPX3* 表达量增长最为显著, 而 *OsSPX4* 表达不受磷浓度影响。水稻 SPX 基因家族通过片段复制扩张并受纯化选择作用, 成员在基因结构和基序组成上较为保守, 但在表达模式上呈现明显的组织特异性和磷胁迫应答分化。

关键词: 水稻; SPX 基因家族; 磷胁迫; 生物信息学; 表达分析

Genome-wide identification and expression analysis of the SPX gene family in rice under phosphorus treatment

Hu Zhao^{1,3,*}, Qian Run², Xie Feng-Pu^{2,*}, and Ying Su-Ping³

¹ School of Biological Science and Technology, Taiyuan Normal University, Jinzhong 030619, Shanxi, China; ² School of Traditional Chinese Medicine, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, Liaoning, China; ³ School of Life Sciences, Nanchang University, Nanchang 330031, Jiangxi, China

Abstract: This study aimed to systematically identify the rice SPX gene family at the whole-genome level, characterize its evolutionary features and expression patterns, and provide a basis for elucidating SPX functions in phosphorus signal transduction. Bioinformatics approaches were used to identify SPX genes in rice and to analyze their physicochemical properties, phylogenetic relationships, gene structures, conserved motifs, promoter *cis*-acting elements, and collinearity. Transcriptomic data and quantitative real-time PCR (RT-qPCR) were used to examine tissue-specific expression and responses to phosphorus stress. Six SPX genes were identified and mapped to five chromosomes. Phylogenetic analysis showed that *OsSPX1* and *OsSPX2* clustered together with 100% bootstrap support, whereas *OsSPX3* formed a well-supported subclade with *OsSPX5* and *OsSPX6*. Collinearity analysis identified two segmental duplication pairs (*OsSPX1/OsSPX2* and *OsSPX5/OsSPX6*), and all K_a/K_s values were < 1 (0.19–0.44), indicating strong purifying selection. Gene structure analysis showed that *OsSPX* members contain 2–3 exons, and conserved motif distributions were highly consistent with the phylogenetic relationships. Promoter analysis identified 135 *cis*-acting elements, mainly related to hormone, light, and stress responses, with methyl jasmonate- and abscisic acid-responsive elements being

本研究由山西省基础研究计划项目(202503021212246)资助。

This study was supported by the Fundamental Research Program of Shanxi Province (202503021212246).

* 通信作者(Corresponding authors): 胡赵, E-mail: zhaohu@tynu.edu.cn; 谢丰璞, E-mail: sxybqcw@163.com

Received (收稿日期): 2025-12-16; Accepted (接受日期): 2026-03-17; Published online (网络出版日期): 2026-03-27.

URL: <https://link.cnki.net/urlid/11.1809.S.20260327.1449.010>

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

the most abundant. RT-qPCR analysis in the ShijinB variety indicated that *OsSPX1*–*OsSPX6* were preferentially expressed in roots, with *OsSPX3* also showing relatively high expression in inflorescences and *OsSPX1* and *OsSPX4* showing relatively high expression in leaves. Under low-phosphorus conditions, *OsSPX1*, *OsSPX2*, *OsSPX3*, *OsSPX5*, and *OsSPX6* were significantly upregulated, with *OsSPX3* showing the strongest induction, whereas *OsSPX4* was not affected by phosphorus availability. Overall, the rice SPX gene family appears to have expanded via segmental duplication and subsequently evolved under purifying selection; although gene structures and motif compositions are relatively conserved, members show clear tissue specificity and differential responsiveness to phosphorus stress.

Keywords: rice; SPX gene family; phosphorus stress; bioinformatics; expression analysis

磷是植物生长发育不可或缺的大量营养元素,不仅在核酸、磷脂、ATP 等关键生物大分子的构成中发挥骨架作用,还广泛参与能量转移、信号转导和酶活性调节等核心生理过程^[1-3]。尽管磷在土壤中总含量丰富,但其极易被固定成难溶性化合物或随水土流失,导致有效磷浓度往往无法满足作物生长需求,这使得磷匮乏成为限制作物产量的主要非生物胁迫因子之一^[4-5]。为应对这一挑战,植物在长期进化过程中形成了一套精细的磷信号感知与应答调控网络,其中,SPX 基因家族被证实是该网络中的关键组分,在维持磷稳态平衡中发挥核心调控作用^[6-8]。

SPX 基因家族因其成员均包含一个由 SPX 结构域命名的保守 N 端区域而得名^[9]。该结构域在真核生物中高度保守,从酵母、植物到人类均存在其同源蛋白,表明其在磷酸盐信号传导和体内平衡调控中具有重要作用^[9-11]。在模式植物拟南芥中,AtSPX 基因家族包含 4 个成员,分别为 *AtSPX1*、*AtSPX2*、*AtSPX3* 和 *AtSPX4*。这些基因所编码的蛋白质仅含有 SPX 结构域,不具备其他已知的保守功能域,其长度约为 300 个氨基酸。这类蛋白质主要作为调控模块,参与细胞内磷信号的感知与转导过程^[12]。例如,AtSPX1 可以与磷信号核心转录因子 AtPHR1 结合,从而调节 AtPHR1 与磷响应基因启动子的结合并影响磷饥饿诱导(PSI)基因的表达^[13]。此外,AtSPX4 也可以与 AtPHR1 相互作用,并将 AtPHR1 保留在细胞质中,以调节植物对磷营养的应答^[14]。这些研究揭示了 SPX 基因在磷信号网络中的多功能调控作用。

水稻作为全球最重要的粮食作物之一,为全球近半数人口提供主粮保障。目前,尽管 *OsSPX* 基因在磷信号转导中的功能已被初步揭示^[15-19],但该家族在全基因组水平的系统性分析仍相对缺乏,成员间的功能分化与调控网络尚不明确。因此,系统解析 SPX 基因家族的进化特征和表达调控机制,对于揭示水稻磷高效利用的分子基础具有重要科学意义。

基于此,本研究采用整合生物信息学与组学分析策略,对水稻 SPX 基因家族进行全基因组尺度系统鉴定,全面解析其染色体分布、理化特性、系统进化关系、基因结构特征、保守基序组成及启动子顺式作用元件分布规律。进一步结合公共转录组数据与 RT-qPCR 试验,系统分析该家族成员在不同组织器官中的表达特异性及在高、低磷条件下的动态响应模式。本研究旨在揭示 SPX 基因家族在水稻磷胁迫应答中的潜在功能分工与协同调控机制,为完善水稻磷信号调控网络理论提供新依据,也为通过分子设计育种培育磷高效水稻新品种提供候选基因资源与理论支撑。

1 材料与方法

1.1 植物材料与处理

本研究以水稻(*Oryza sativa* L.)粳稻品种 ShijinB 为研究材料^[20]。种子经 3% NaClO 溶液表面消毒 15 min,用无菌水冲洗 5 次后,置于湿润滤纸上于 28℃ 恒温培养箱中暗培养催芽 2 d。待露白后,播种于盛有木村 B 营养液(分别设置高磷和低磷浓度;高磷:0.180 mmol L⁻¹ KH₂PO₄,低磷:0.018 mmol L⁻¹ KH₂PO₄)的塑料盆钵中,于人工气候室中培养。通过添加等摩尔 KCl 以维持钾离子浓度平衡。营养液每 2 d 更换一次。培养条件为:光周期 14 h/28℃ 光照、10 h/25℃ 黑暗,相对湿度 70%,光照强度 300 μmol m⁻² s⁻¹。

1.2 SPX 基因家族成员的鉴定

从 Phytozome 数据库^[21] (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>)获取水稻(*Oryza sativa* L.)参考基因组 MSU v7.0 版本的基因组序列、蛋白质序列及 GFF3 注释文件。基于 Pfam 数据库^[22] (<http://pfam.xfam.org/>)提供的 OsSPX 蛋白特征保守结构域(PS51382)的隐马尔可夫模型,采用 HMMER 3.0 软件包的 hmmsearch 程序对水稻全蛋白质序列进行系统性筛选,E 值阈值设定为 1×10⁻⁵。为进一步验证候

选蛋白的保守结构域完整性, 分别利用 NCBI 保守结构域数据库^[23] (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>)及 SMART^[24]在线工具对初步筛选获得的序列进行结构域验证。最终, 仅将同时通过上述多种方法鉴定且含有完整 SPX 结构域的蛋白序列确定为水稻 SPX 基因家族成员, 并纳入后续分析。

1.3 蛋白理化性质与染色体定位分析

采用 ExPASy^[25]在线平台的 ProtParam 工具^[26]对鉴定获得的水稻 SPX 蛋白进行基本理化性质分析, 包括氨基酸数目、分子量、理论等电点、不稳定指数、脂肪族指数和总平均亲水性等关键参数。基于水稻基因组注释信息, 运用 TBtools 软件^[27]的“Gene Location Visualize from GFF/GFF3”功能模块, 对 OsSPX 基因家族成员在染色体上的分布位置进行可视化展示, 明确其基因组定位特征。

1.4 系统进化树、共线性分析与 K_a/K_s 分析

采用 ClustalW 程序^[28]对水稻 SPX 蛋白的全长氨基酸序列进行多序列比对。基于比对结果, 运用 MEGA 11.0 软件^[29], 采用邻接法构建系统进化树, 设置 Bootstrap 重复次数为 1000 次以评估系统发育关系的可靠性。通过 MCScanX 软件^[30]分析水稻基因组内的共线性关系, 并利用 TBtools 软件^[27]的“Advanced Circos”和“Dual Synteny Plot”功能模块分别对全基因组范围的基因复制事件和特异性共线性区块进行可视化展示。最后, 基于 TBtools 的 K_a/K_s 计算功能, 对鉴定到的复制基因对进行选择压力分析。

1.5 基因结构与保守基序分析

利用 TBtools-II 软件的“GFF3 Sequence Extract”功能模块, 分别提取各 OsSPX 基因的编码序列及相应基因组 DNA 序列, 并通过“Gene Structure View”功能实现外显子-内含子结构的可视化呈现。采用 MEME Suite^[31]在线工具对 OsSPX 蛋白的保守基序进行分析, 设定最大基序数为 10, 基序宽度范围为 6~50 个氨基酸。

1.6 启动子顺式作用元件分析

利用 PlantCARE 在线数据库^[32]对各 OsSPX 基因转录起始位点上游 2000 bp 的启动子区域进行系统性顺式作用元件扫描与功能注释。利用 TBtools 软件对元件的类型分布特征及其在启动子区的相对位置进行统计归纳可视化, 并通过 Prism 9 软件构建不同类别顺式作用元件出现频率的可视化图谱。

1.7 表达模式分析

基于 NCBI 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)已公开的水稻转录组数据, 分别获取不同组织(项目编号: PRJNA482217, 水稻品种: 日本晴)及磷胁迫处理(项目编号为 PRJNA735781, 水稻品种为日本晴)的 RNA-seq 数据集。对原始测序数据进行质量控制, 包括使用 FastQC 评估数据质量, 并通过 Trimmomatic 去除接头序列和低质量碱基。随后采用 HISAT2 软件将质控后的高质量读数与水稻参考基因组进行比对, 利用 StringTie 工具进行转录本组装和表达量估算, 最终获得各基因在不同样本中的 FPKM 值作为表达水平定量指标。

1.8 RNA 提取与实时荧光定量 PCR

使用植物总 RNA 提取试剂盒 TRNzol Universal (TIANGEN, Cat no. DP424)分别从低磷和正常磷处理的水稻根样品中提取总 RNA。利用 Fasting RT kit (TIANGEN, Cat no. KR116)试剂盒将 1 μ g 总 RNA 反转录成 cDNA。使用 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 试剂盒, 在实时荧光定量 PCR 仪上进行扩增反应。反应程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 95 $^{\circ}$ C 10 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环。以水稻 *Actin1* 作为内参基因。所有试验均设置 3 次生物学重复。用于 qPCR 的引物序列使用 Primer-BLAST 设计并交由公司合成, 具体引物序列见附表 1。

2 结果与分析

2.1 水稻 SPX 基因家族成员的鉴定与基本理化性质分析

通过 HMMER 搜索与 BLASTP 比对相结合的策略, 从水稻全基因组中共鉴定出 6 个非冗余的 OsSPX 基因家族成员, 命名为 OsSPX1~OsSPX6。这些成员分布在 5 条不同的染色体上(图 1), 表明 OsSPX 基因家族在水稻基因组中分布较为分散。理化性质分析结果显示(表 1), 该家族成员在蛋白质基本特性上存在明显差异。OsSPX 蛋白的氨基酸数目在 234 (OsSPX6)至 320 (OsSPX4)之间, 相应的分子量范围为 25.9~35.7 kD。理论等电点(pI)预测显示, 大部分蛋白的 pI 小于 7.0, 表现为酸性蛋白特性, 其中, OsSPX4 的 pI 最低(4.98), 而 OsSPX3 的 pI 为 9.56, 是家族中唯一的碱性蛋白。所有 SPX 蛋白的不稳定系数均大于 40, 表明这些蛋白在体外均属于不稳定蛋白。脂肪族指数分析显示, OsSPX5 (92.11)和 OsSPX6 (91.45)的脂肪族指数较高, 而 OsSPX2

(76.29)的脂肪族指数相对较低。此外,所有蛋白的亲水性总平均值(grand average of hydropathicity, GRAVY)均为负值,范围从−0.169 (OsSPX6)到−0.543 (OsSPX4),证实 OsSPX 蛋白均为亲水性蛋白。

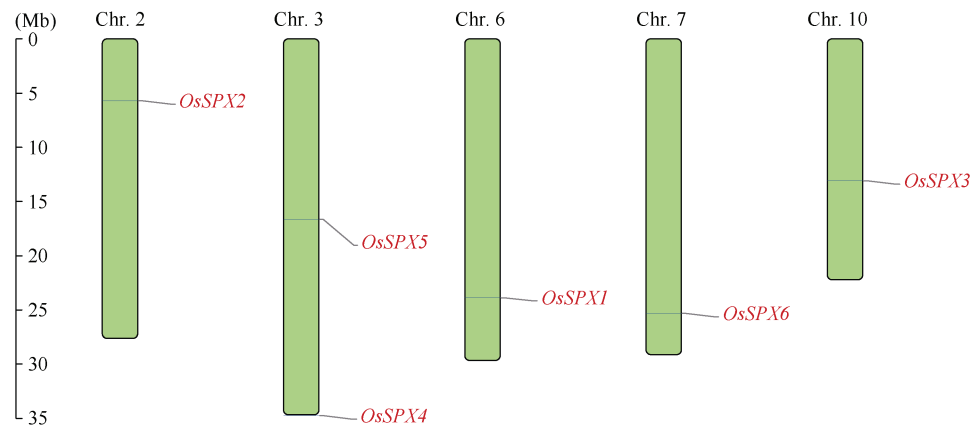


图 1 水稻 OsSPX 基因家族染色体定位
Fig. 1 Chromosomal localization of the OsSPX gene family in rice

表 1 水稻 SPX 基因家族成员基本信息
Table 1 Basic information of SPX gene family members in rice

基因 Gene	基因 ID Gene ID	蛋白质长度 Protein length (aa)	相对分子质量 Molecular weight (kD)	等电点 pI	不稳定系数 Instability index	脂肪系数 Aliphatic index	亲水性总平 均值 GRAVY
<i>OsSPX1</i>	<i>Os06g0603600</i>	295	33,111.71	5.21	58.57	83.02	−0.516
<i>OsSPX2</i>	<i>Os02g0202200</i>	280	30,955.09	5.67	43.58	76.29	−0.507
<i>OsSPX3</i>	<i>Os10g0392600</i>	277	30,844.51	9.56	56.96	81.01	−0.345
<i>OsSPX4</i>	<i>Os03g0827500</i>	320	35,772.12	4.98	48.49	78.75	−0.543
<i>OsSPX5</i>	<i>Os03g0406100</i>	247	27,513.64	6.93	66.76	92.11	−0.190
<i>OsSPX6</i>	<i>Os07g0614700</i>	234	25,959.86	6.41	52.46	91.45	−0.169

GRAVY: grand average of hydropathicity; pI: isoelectric point.

2.2 OsSPX 基因家族系统进化、共线性与进化压力分析

为阐明水稻 SPX 基因家族的进化关系,本研究基于 6 个 OsSPX 蛋白的氨基酸序列构建了系统进化树(图 2-A)。系统发育分析显示,OsSPX5 与 OsSPX6 以 93%的自展支持率紧密聚类,表明二者具有高度同源性和功能保守性;同时,OsSPX1 与 OsSPX2 以 100%的自展支持率形成稳定聚类,提示其可能经历了相似的进化历程。值得关注的是,OsSPX3 与 OsSPX5/OsSPX6以 97%的自展支持率形成一个稳定

的亚簇,这一聚类关系揭示了 OsSPX3 在进化上更接近于该分支成员。为进一步解析水稻 SPX 基因家族的扩张机制,本研究进行了基因组共线性分析(图 2-B)。结果表明,水稻 SPX 家族的扩增主要源于片段复制事件,共鉴定到 2 对片段复制基因(*OsSPX1/OsSPX2* 和 *OsSPX5/OsSPX6*),而未发现串联重复事件。通过对这 2 对复制基因进行选择压力分析(表 2),发现其 K_a/K_s 值均显著小于 1 (0.19~0.44),这表明 *OsSPX* 基因在进化过程中受到了强烈的纯化选择压力。

表 2 OsSPX 基因家族 K_a/K_s 值
Table 2 K_a/K_s values of the OsSPX gene family

序列 1 Seq_1	序列 2 Seq_2	非同义替换率 K_a	同义替换率 K_s	非同义替换率与同义替换率之比 K_a/K_s
OsSPX2	OsSPX1	0.182907702	0.959501343	0.190627875
OsSPX5	OsSPX6	0.256450887	0.574747502	0.446197480

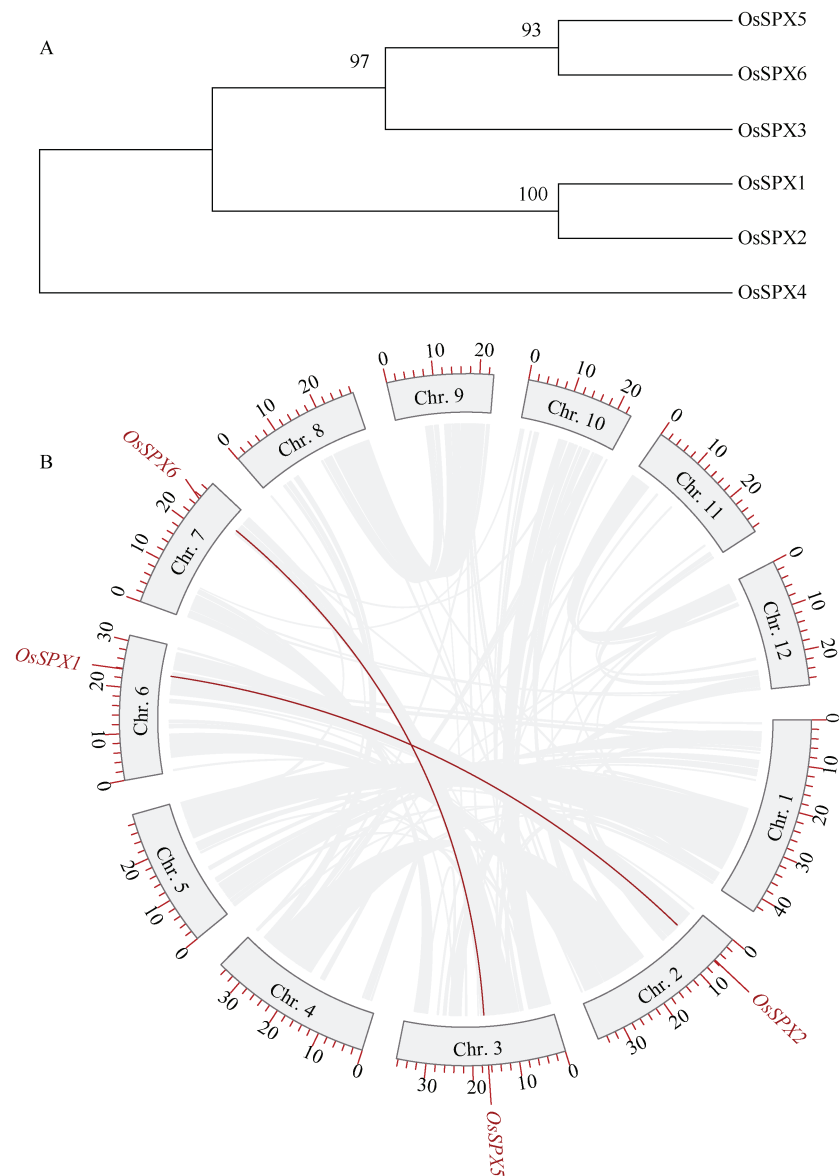
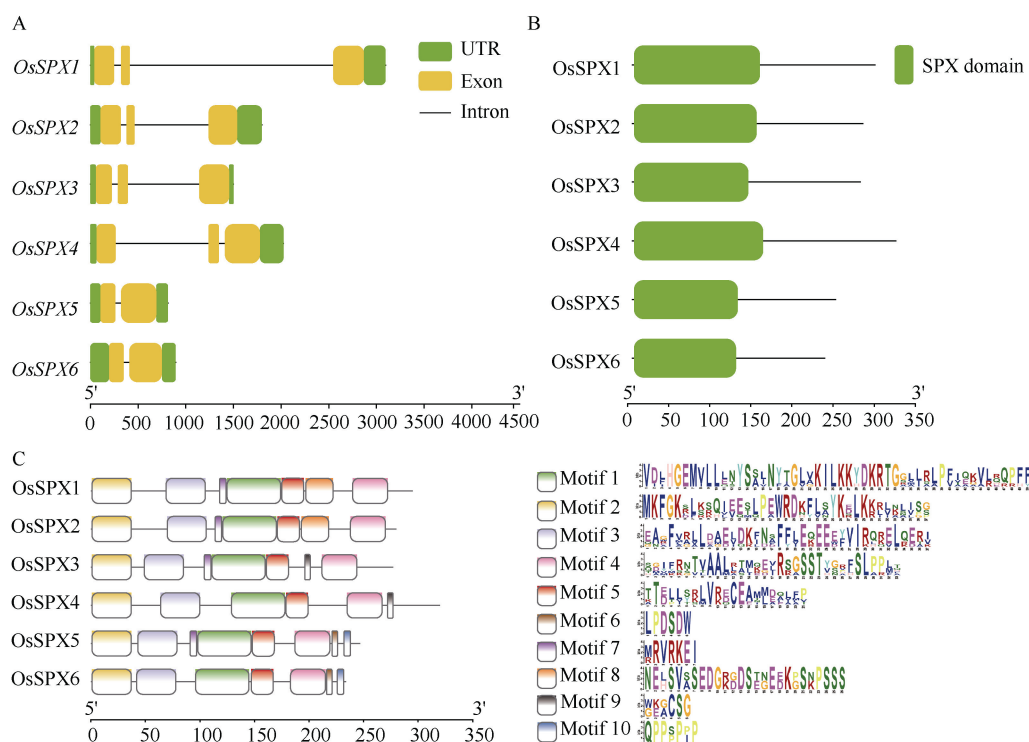


图 2 OsSPX 基因家族系统进化树(A)和共线性(B)分析
Fig. 2 Phylogenetic (A) and collinearity (B) analyses of the OsSPX gene family

2.3 *OsSPX* 基因结构、保守基序和结构域分析

为解析水稻 *OsSPX* 基因家族的结构特征, 本研究对 *OsSPX* 基因家族成员的外显子-内含子结构进行了系统分析(图 3-A)。结果显示, 该家族基因结构相对简单且保守, 所有成员的外显子数量仅为 2 个或 3 个。其中, *OsSPX1*~*OsSPX4* 均含有 3 个外显子, 而 *OsSPX5* 和 *OsSPX6* 则含有 2 个外显子。保守结构域分析证实, 所有 6 个 *OsSPX* 蛋白均包含典型的 SPX 结构域(图 3-B), 体现了该基因家族的功能保守性。通过 MEME 软件进行的保守基序分析共鉴定出 10 个保守基序(Motif 1~Motif 10) (图 3-C)。基序组成分析

显示, Motif 1~Motif 5 在所有 *OsSPX* 蛋白中普遍存在, 构成了该家族的核心基序组成。Motif 6 和 Motif 10 为 *OsSPX5* 和 *OsSPX6* 所特有, 显示出这 2 个成员的特异性序列特征。Motif 9 的选择性分布特征明显, 仅存在于 *OsSPX3* 和 *OsSPX4* 中。此外, Motif 7 在除 *OsSPX4* 和 *OsSPX6* 外的所有成员中均有分布。值得关注的是, 基序分布模式与系统进化分析结果高度一致: *OsSPX1* 和 *OsSPX2* 具有完全相同的基序组成; *OsSPX5* 和 *OsSPX6* 仅存在 Motif 7 的细微差异, 这一发现进一步支持了它们在进化上的紧密关系, 同时也暗示了亚家族内功能的高度保守性。

图 3 *OsSPX* 基因家族成员的基因结构(A)、结构域(B)和保守基序(C)Fig. 3 Gene structure (A), domains (B), and conserved motifs (C) of *OsSPX* gene family members

2.4 *OsSPX* 基因启动子顺式作用元件分析

为深入探究 *OsSPX* 基因的转录调控机制, 本研究对 6 个 *OsSPX* 基因起始密码子上游 2000 bp 的启动子序列进行了顺式作用元件分析, 共鉴定出 135 个顺式作用元件(图 4)。这些元件可分为激素响应、光响应、胁迫响应和组织特异性等不同类型(图 4)。在激素响应元件中, 脱落酸响应元件(ABRE)共有 13 个, 广泛分布于 *OsSPX2*、*OsSPX4*、*OsSPX5* 和 *OsSPX6* 中; 茉莉酸甲酯响应元件 CGTCA-motif 和 TGACG-motif 各 14 个, 在所有基因中均有分布, 尤其在 *OsSPX2*、*OsSPX3* 和 *OsSPX4* 中较为富集; 水杨酸响应元件(TCA-element)共 4 个, 主要出现在 *OsSPX2* 和 *OsSPX3* 中; 赤霉素响应元件(包括 P-box、GARE-motif 和 TATC-box)共 8 个, 分散于多个基因中。这些激素响应元件的广泛存在, 暗示 *OsSPX* 基因可能通过激素信号通路参与磷胁迫下的适应性生长调控。光响应元件种类较多, 包括 G-box、Box 4、GT1-motif、I-box、AE-box 和 GATA-motif, 其中, Box 4 数量最多(15 个), 在 *OsSPX1*、*OsSPX3* 和 *OsSPX6* 中分布较多, 表明这些基因可能受到光调控表达, 进而协调光合作用与磷素利用效率。胁迫响应元件中, 低温响应元件(LTR)仅在 *OsSPX2* 中有 1 个; 干

旱响应元件(MBS)共 5 个, 分布于 *OsSPX2*、*OsSPX3*、*OsSPX4* 和 *OsSPX5* 中, 提示这些基因可能参与低磷诱发的干旱交叉适应过程; 厌氧诱导元件(ARE)共 11 个, 在 *OsSPX4* 和 *OsSPX6* 中数量较多, 推测这 2 个基因可能在磷饥饿导致的根系缺氧环境中发挥重要调控作用; 防御与胁迫响应元件(TC-rich repeats)共 2 个, 仅存在于 *OsSPX3* 中。组织特异性与发育相关元件中, 分生组织表达相关元件(CAT-box)共 2 个, 分别位于 *OsSPX4* 和 *OsSPX6* 中; 胚乳表达相关元件(GCN4_motif)仅 1 个, 出现在 *OsSPX1* 中; 昼夜节律调控元件(circadian)共 2 个, 分别位于 *OsSPX1* 和 *OsSPX3* 中, 提示这 2 个基因可能在调控磷的动态储存与昼夜节律性吸收方面具有特定功能。从各基因的元素总数来看, *OsSPX2* 最多(32 个), 其次为 *OsSPX3* (25 个)、*OsSPX5* (22 个)、*OsSPX6* (20 个)、*OsSPX4* (19 个)和 *OsSPX1* (17 个)。综合分析表明, *OsSPX* 基因家族启动子普遍富含激素和光响应元件, 同时不同基因在元素组成上存在明显差异, 暗示 *OsSPX* 基因可能主要通过激素信号网络介导低磷胁迫下的适应性生长调控, 并在协调光合作用与磷素利用效率方面发挥差异化功能。

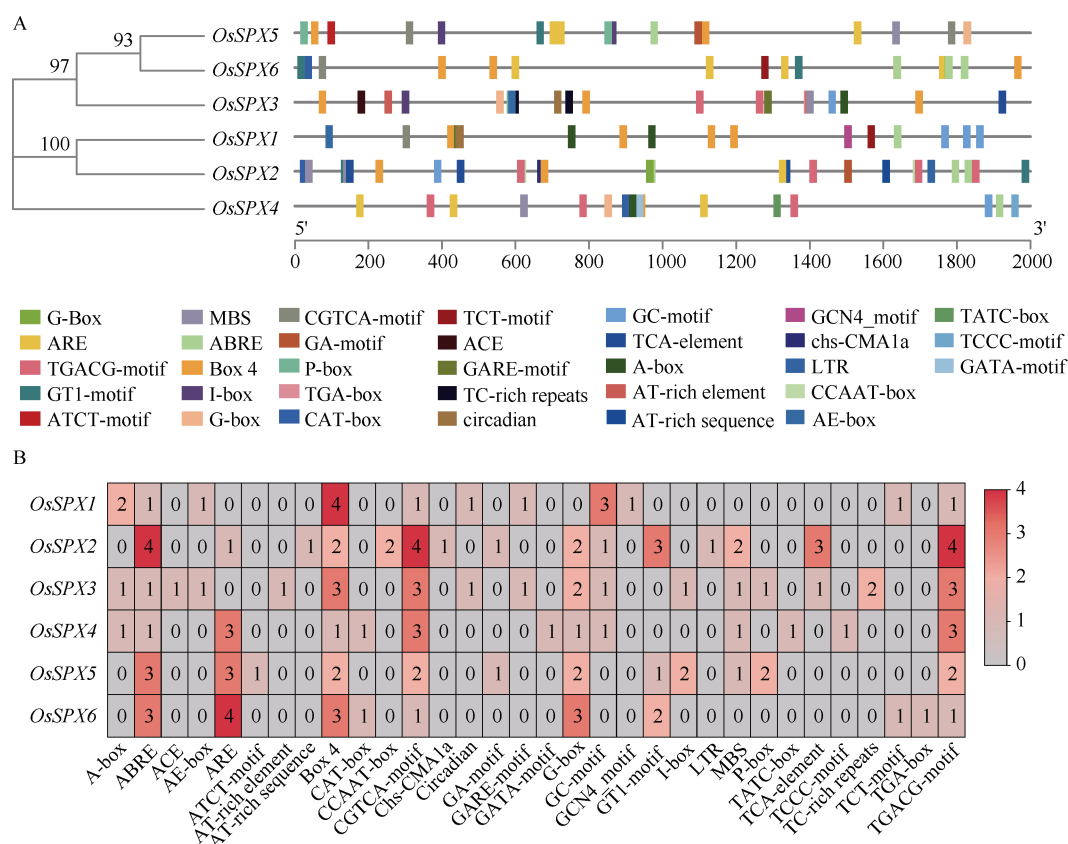


图 4 *OsSPX* 基因启动子区域顺式作用元件分布(A)和数量统计(B)

Fig. 4 Distribution (A) and quantitative (B) of *cis*-acting elements in *OsSPX* promoter regions

2.5 *OsSPX* 基因的组织表达模式分析

为系统探究 *OsSPX* 基因家族成员在水稻不同组织中的表达模式, 本研究整合了公共转录组数据分析(图 5-A)与 RT-qPCR 验证结果(图 5-B)。综合分析表明, 部分基因的表达模式与转录组数据一致, 部分基因存在差异, 反映了品种和试验方法可能带来的表达偏差(图 5)。其中, *OsSPX5* 的表达模式在转录组数据与 qPCR 结果中均明确显示为在根中表达较高、在其他组织中表达较低的根偏好性特征。与之相比, 其他成员显示出更复杂的表达格局。*OsSPX3* 在转录组数据中表现出极其显著的花序表达优势, 暗示其可能参与生殖发育调控; qPCR 结果同样支持其在花序中的高表达, 但同时揭示出其在根中表达最高的新特征。*OsSPX6* 在转录组数据中呈现典型的叶片特异性表达, 而 qPCR 则显示其在根中表达最高, 叶片次高, 提示其不同组织中可能均具有重要功能, 且表达模式可能存在品种差异。从器官表达偏好来看, *OsSPX3* 在 2 种数据中均显示在花序中有较高表达, 表现出一定的生殖器官表达倾向。

OsSPX1 和 *OsSPX4* 则在叶片中持续表现出活跃表达, 显示出与营养器官功能的潜在关联。值得注意的是, qPCR 结果一致表明, *OsSPX1*、*OsSPX2*、*OsSPX3*、*OsSPX4*、*OsSPX5* 和 *OsSPX6* 在 ShijinB 品种的根中表达最高, 这一普遍的根偏好性表达特征在转录组数据中并未完全显现, 可能反映了该品种特有的表达调控模式。

2.6 不同磷浓度条件下 *OsSPX* 基因的表达模式分析

为阐明 *OsSPX* 基因家族在水稻磷胁迫应答中的转录调控特征, 本研究基于转录组数据分析发现, 该基因家族成员在响应磷有效性变化时呈现出显著的表达分化模式。除 *OsSPX4* 基因外, 其他成员在低磷条件下均表现出转录水平上调, 显示出对磷饥饿胁迫的高度敏感性(图 6-A 和附表 2)。同时, 本研究利用 RT-qPCR 分析了 *OsSPX* 基因家族成员在高磷(HP)和低磷(LP)环境中的表达情况(图 6-B), 并发现其表达情况与转录组数据一致。具体而言, *OsSPX1* 在低磷胁迫下表达量显著提升, 表现出典型的低磷

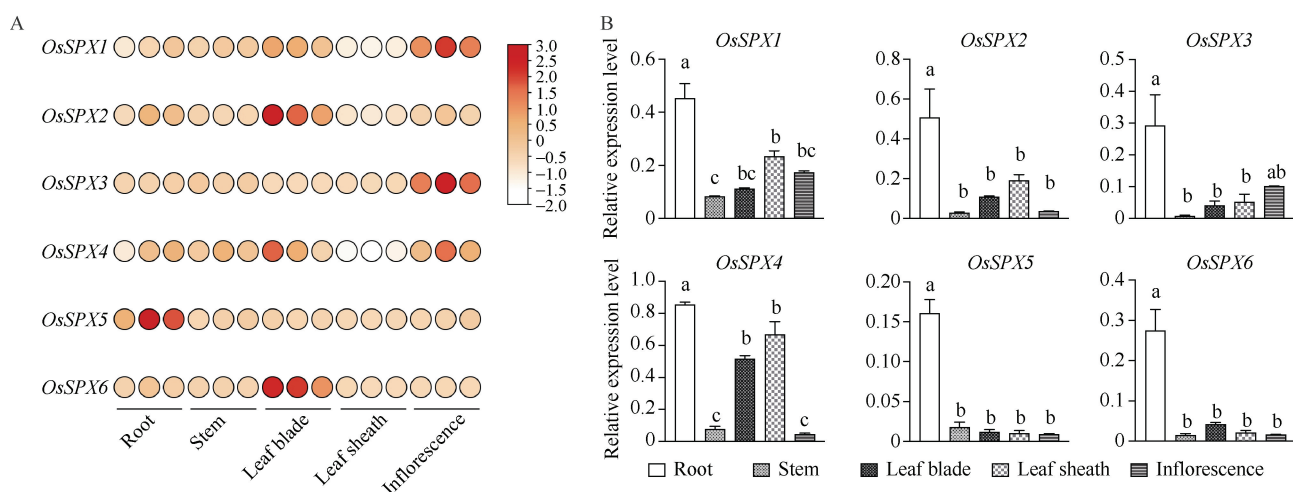


图 5 转录组(A)和 RT-qPCR (B)分析 *OsSPX* 基因在不同水稻组织中的表达模式

Fig. 5 Expression patterns of *OsSPX* genes in different rice tissues based on transcriptomics (A) and RT-qPCR (B)

柱上不同小写字母表示在 $P < 0.05$ 水平差异显著。Different lowercase letters above the bars indicate significant differences at $P < 0.05$.

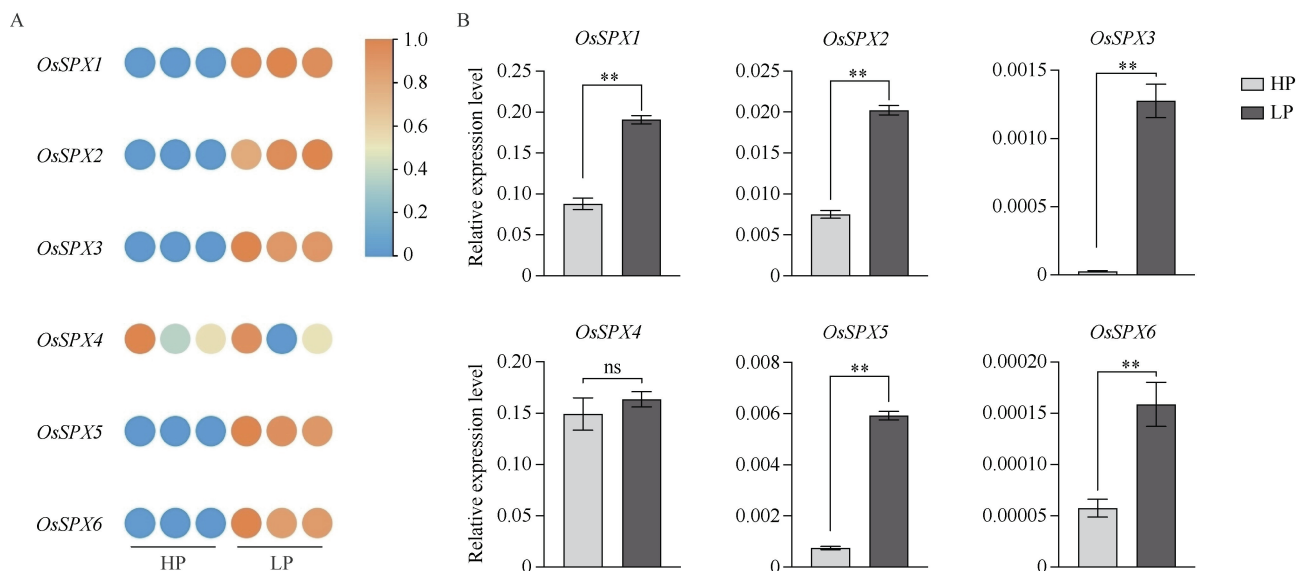


图 6 转录组(A)和 RT-qPCR (B)分析 *OsSPX* 基因在不同磷条件下的表达模式

Fig. 6 Expression patterns of *OsSPX* genes under different phosphorus conditions based on transcriptomics (A) and RT-qPCR (B)

, $P < 0.01$; ns: 差异不显著; HP: 高磷; LP: 低磷。, $P < 0.01$; ns, no significant difference; HP, high phosphorus; LP, low phosphorus.

诱导特征。*OsSPX2* 同样对低磷环境敏感, 其转录水平在缺磷条件下呈现数倍增长。尤为值得注意的是, *OsSPX3* 在高磷条件下几乎不表达, 而在低磷胁迫下被强烈激活, 表现出极其显著的诱导效应。*OsSPX5* 和 *OsSPX6* 的响应也较为突出, 二者在低磷条件下的表达量均呈现显著增长。与此形成鲜明对比的是, *OsSPX4* 在不同磷条件下均保持相对稳定的转录水平, 其表达不受外界磷浓度变化的影响, 表明该基因的调控可能不发生在转录水平, 而是通过转录后或翻译后等其他机制参与磷信号调控。

3 讨论

SPX 基因家族作为植物磷信号网络的核心调控组分^[6], 其在作物磷营养高效利用中的作用日益受到关注。本研究通过对水稻 SPX 基因家族的系统分析, 揭示了其在进化历程、结构特征及表达调控方面的独特规律, 为深入理解该家族在水稻磷稳态维持中的功能分化提供了新的见解。

与拟南芥 *AtSPX* 家族 (仅含 4 个成员, *AtSPX1*~*AtSPX4*)^[12]相比, 水稻 *OsSPX* 家族成员数

量相对较多,本研究共鉴定到 6 个 *OsSPX* 基因。在这 6 个成员中,2 对由片段复制产生的基因对(*OsSPX1/OsSPX2* 和 *OsSPX5/OsSPX6*)在进化过程中均经历了强烈的纯化选择压力($K_a/K_s < 1$) (表 2),表明其编码区序列的功能完整性受到严格约束。这种选择压力直接体现为 2 对基因在基序组成上的高度保守性(图 3),暗示它们在维持水稻基础磷信号转导中承担着不可替代的核心功能。从进化策略的角度分析,尽管基因复制常被视为功能分化的起点,但 *OsSPX* 家族中部分复制基因却保留了高度的功能冗余。这种冗余并非进化上的“浪费”,而可能是一种应对环境波动的“遗传缓冲”机制:当某一成员因突变而失活时,其同源基因仍可维持基本的磷信号输出,从而保障水稻在磷匮乏环境中的生存适应性。这种“核心功能保守、冗余保障稳定”的进化设计,体现了水稻在长期适应多变土壤磷条件过程中形成的稳健性策略。此外,值得关注的是,*OsSPX3* 与 *OsSPX5/OsSPX6* 以 97%的支持率形成稳定亚簇,但其基序组成又与 *OsSPX4* 更为接近(图 3),这种复杂的进化关系可能反映了其在功能上的特殊性,或许在连接不同磷信号通路中扮演着桥梁角色。

启动子顺式作用元件分析揭示了 *OsSPX* 基因家族调控网络的复杂性(图 4)。所有成员均含有丰富的茉莉酸甲酯响应元件,同时,多数成员还含有脱落酸响应元件,这一特征与磷胁迫通常伴随激素信号变化的现象高度契合。研究表明,磷饥饿会引发植物体内茉莉酸和脱落酸水平的显著变化^[33-34],提示这些激素可能通过直接调控 *OsSPX* 基因表达,在调控磷信号与其他应激反应之间建立交叉对话,从而协调植物对多重环境胁迫的整体适应。此外,光响应元件的普遍存在提示,*OsSPX* 基因可能参与整合光信号与磷营养信号。这一调控设计具有重要的生理意义:植物需要根据地上部的的光能供给动态调整根系的磷吸收与分配策略,*OsSPX* 基因或在这一“源-库”协调过程中发挥中介作用,确保碳流与磷流的协同优化。特别值得注意的是,不同成员在启动子元件组成上存在明显差异:*OsSPX2* 拥有最复杂的调控元件网络,推测其可能在整合多重信号、应对复合逆境中发挥核心作用;而 *OsSPX6* 则富含厌氧诱导元件,提示其可能在淹水或缺氧条件下特异性地调控磷响应,这或许反映了水稻作为湿地作物对淹水环境中磷有效性变化的分子适应策略。

表达谱分析结果显示,*OsSPX* 基因家族成员在

水稻中表现出多样且复杂的组织特异性表达模式(图 5)。值得注意的是,尽管公共转录组数据与本研究在 ShijinB 品种中的 qPCR 验证结果在部分基因(如 *OsSPX5*)上高度一致,确认了其稳定的根偏好性表达,但更多成员(如 *OsSPX3*)的表达模式存在显著差异。这些差异可能主要源于品种特异性的调控机制,因为不同水稻品种的遗传背景可能导致同一基因表达模式发生改变;同时也可能反映了不同试验平台(高通量测序与 qPCR)在灵敏度与动态范围上的技术偏差。尤为重要的是,qPCR 结果揭示在 ShijinB 品种中,所有 *OsSPX* 基因(*OsSPX1~OsSPX6*)均存在显著的根中高表达,这一共性暗示该基因家族在根系发育或磷养分吸收等根部特异生理过程中可能扮演着核心角色。而 *OsSPX3* 在花序中的较高表达,以及 *OsSPX1* 和 *OsSPX4* 在叶片中的活跃表达,则进一步提示家族内部分工的出现,即不同成员可能分别调控生殖发育、光合作用或磷转运等不同生物学过程。

在不同磷浓度条件下的表达分析揭示了 *OsSPX* 基因家族成员在磷胁迫应答中的功能多样性(图 6)。大多数成员在低磷条件下表现出的强烈上调表达,符合 *OsSPX* 蛋白作为磷饥饿诱导因子的典型特征。特别是 *OsSPX3* 在低磷条件下的表达极显著增长,凸显了它们在磷饥饿应答中的关键地位。这种强烈的诱导表达特性,结合它们在根中的基础表达,说明这个基因可能是水稻应对磷胁迫的一线响应因子。与此形成鲜明对比的是,*OsSPX4* 在不同磷条件下保持稳定的转录水平,表明其可能通过蛋白质水平的调控而非转录调控来行使功能。已有研究证实了这一推测:低磷胁迫下,*OsSPX4* 蛋白通过 26S 蛋白酶体途径被快速降解,从而释放与之互作的磷信号核心转录因子 *OsPHR2* 入核,进而激活下游磷饥饿响应基因的表达^[16]。这种应答模式的多样性体现了水稻 *SPX* 基因家族在磷信号调控中的功能分化,既有快速响应的“感应器”,也有保持稳定的“调节器”,共同构成了精细的磷稳态调控网络。

References

- [1] 侯赛赛,李畅,李青云,等. 不同供磷水平下大白菜的生长和磷吸收策略研究. 作物杂志, 2025(1): 220-226.
Hou S S, Li C, Li Q Y, et al. Study on strategies of growth and phosphorus uptake of Chinese cabbage at different phosphorus supply levels. Crops, 2025(1): 220-226 (in Chinese with English abstract).

- [2] 肖晨星, 高璐阳, 马志明. 植物对低磷胁迫的适应机制. 浙江农业科学, 2024, 65: 2206–2213.
Xiao C X, Gao L Y, Ma Z M. Mechanisms of plant adaptation to low phosphorus stress. J Zhejiang Agric Sci, 2024, 65: 2206–2213 (in Chinese with English abstract).
- [3] Luan M D, Tang R J, Tang Y M, et al. Transport and homeostasis of potassium and phosphate: limiting factors for sustainable crop production. J Exp Bot, 2017, 68: 3091–3105.
- [4] Shen J B, Yuan L X, Zhang J L, et al. Phosphorus dynamics: from soil to plant. Plant Physiol, 2011, 156: 997–1005.
- [5] López-Arredondo D L, Leyva-González M A, González-Morales S I, et al. Phosphate nutrition: improving low-phosphate tolerance in crops. Annu Rev Plant Biol, 2014, 65: 95–123.
- [6] Secco D, Wang C, Arpat B A, et al. The emerging importance of the SPX domain-containing proteins in phosphate homeostasis. New Phytol, 2012, 193: 842–851.
- [7] 单玉静, 王召军, 程泽华, 等. *NtSPX4* 基因敲除对烟草苗期磷吸收和生长发育的影响研究. 中国烟草学报, 2022, 28(1): 78–85.
Shan Y J, Wang Z J, Cheng Z H, et al. Effect of *NtSPX4* gene knockout on phosphorus absorption and growth of tobacco plants in seedling stage. Acta Tabacaria Sin, 2022, 28(1): 78–85 (in Chinese with English abstract).
- [8] 陈春阳, 段文, 薛宝平, 等. 植物防止磷过量积累的分子机制研究进展. 分子植物育种, 2023, 21: 2655–2664.
Chen C Y, Duan W, Xue B P, et al. Research advances in molecular mechanisms of plants preventing phosphate overaccumulation. Mol Plant Breed, 2023, 21: 2655–2664 (in Chinese with English abstract).
- [9] Jung J Y, Ried M K, Hothorn M, et al. Control of plant phosphate homeostasis by inositol pyrophosphates and the SPX domain. Curr Opin Biotechnol, 2018, 49: 156–162.
- [10] Secco D, Wang C, Shou H X, et al. Phosphate homeostasis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, the key role of the SPX domain-containing proteins. FEBS Lett, 2012, 586: 289–295.
- [11] Yan R, Chen H W, Liu C Y, et al. Human XPR1 structures reveal phosphate export mechanism. Nature, 2024, 633: 960–967.
- [12] Duan K, Yi K K, Dang L, et al. Characterization of a sub-family of *Arabidopsis* genes with the SPX domain reveals their diverse functions in plant tolerance to phosphorus starvation. Plant J, 2008, 54: 965–975.
- [13] Qi W J, Manfield I W, Muench S P, et al. AtSPX1 affects the AtPHR1-DNA-binding equilibrium by binding monomeric AtPHR1 in solution. Biochem J, 2017, 474: 3675–3687.
- [14] Osorio M B, Ng S, Berkowitz O, et al. SPX4 acts on PHR1-dependent and -independent regulation of shoot phosphorus status in *Arabidopsis*. Plant Physiol, 2019, 181: 332–352.
- [15] Liu F, Wang Z Y, Ren H Y, et al. OsSPX1 suppresses the function of OsPHR2 in the regulation of expression of OsPT2 and phosphate homeostasis in shoots of rice. Plant J, 2010, 62: 508–517.
- [16] Lyu Q D, Zhong Y J, Wang Y G, et al. SPX4 negatively regulates phosphate signaling and homeostasis through its interaction with PHR2 in rice. Plant Cell, 2014, 26: 1586–1597.
- [17] Yao Z F, Liang C Y, Zhang Q, et al. SPX1 is an important component in the phosphorus signalling network of common bean regulating root growth and phosphorus homeostasis. J Exp Bot, 2014, 65: 3299–3310.
- [18] Wang Z Y, Ruan W Y, Shi J, et al. Rice SPX1 and SPX2 inhibit phosphate starvation responses through interacting with PHR2 in a phosphate-dependent manner. Proc Natl Acad Sci USA, 2014, 111: 14953–14958.
- [19] Shi J, Hu H, Zhang K M, et al. The paralogous *SPX3* and *SPX5* genes redundantly modulate Pi homeostasis in rice. J Exp Bot, 2014, 65: 859–870.
- [20] Hu Z, Tang Y T, Ying S P, et al. OsCBL1 modulates the nitrate-induced phosphate response by altering OsNLP4 cytoplasmic-nucleus shuttling. Rice, 2025, 18: 11.
- [21] Goodstein D M, Shu S Q, Howson R, et al. Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. Nucleic Acids Res, 2012, 40: D1178–D1186.
- [22] Mistry J, Chuguransky S, Williams L, et al. Pfam: the protein families database in 2021. Nucleic Acids Res, 2021, 49: D412–D419.
- [23] Yang M Z, Derbyshire M K, Yamashita R A, et al. NCBI's conserved domain database and tools for protein domain analysis. Curr Protoc Bioinform, 2020, 69: e90.
- [24] Letunic I, Khedkar S, Bork P. SMART: recent updates, new developments and status in 2020. Nucleic Acids Res, 2021, 49: D458–D460.
- [25] Wilkins M R, Gasteiger E, Bairoch A, et al. Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. Methods Mol Biol, 1999, 112: 531–552.
- [26] Garg V K, Avashthi H, Tiwari A, et al. MFPPi-multi FASTA ProtParam interface. Bioinformatics, 2016, 12: 74–77.
- [27] Chen C J, Wu Y, Li J W, et al. TBtools-II: a “one for all, all for one” bioinformatics platform for biological big-data mining. Mol Plant, 2023, 16: 1733–1742.
- [28] Li K B. ClustalW-MPI: ClustalW analysis using distributed and parallel computing. Bioinformatics, 2003, 19: 1585–1586.
- [29] Kumar S, Stecher G, Li M, et al. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. Mol Biol Evol, 2018, 35: 1547–1549.
- [30] Wang Y P, Tang H B, DeBarry J D, et al. MCSanX: a toolkit for detection and evolutionary analysis of gene synteny and collinearity. Nucleic Acids Res, 2012, 40: e49.
- [31] Bailey T L, Johnson J, Grant C E, et al. The MEME suite. Nucleic Acids Res, 2015, 43: W39–W49.
- [32] Lescot M, Déhais P, Thijs G, et al. PlantCARE, a database of plant *cis*-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. Nucleic Acids Res, 2002, 30: 325–327.
- [33] Zhang Y, Li T T, Wang L F, et al. Abscissic acid facilitates phosphate acquisition through the transcription factor ABA INSENSITIVE5 in *Arabidopsis*. Plant J, 2022, 111: 269–281.
- [34] Li L Y, Zhang X Y, Li D, et al. CsPHRs-CsJAZ3 incorporates phosphate signaling and jasmonate pathway to regulate catechin biosynthesis in *Camellia sinensis*. Horticulture Res, 2024, 11: uhael178.

附表 1 RT-qPCR 引物序列
Table S1 Primer sequence for RT-qPCR

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'-3')
qOsSPX1-F	AATACATCATCCGCCAGAAGGAGC
qOsSPX1-R	AGCCCCAGTCCTCTTGTCATA
qOsSPX2-F	GCTGCTCGAGAATTACAGCG
qOsSPX2-R	GTCGGTGGTGAAGAAGGGTT
qOsSPX3-F	GCCGTCAACTACACAGGCG
qOsSPX3-R	TCCGTCGTGAAGAACGGCT
qOsSPX4-F	ATCGAGAGGGAGGAGTGGTA
qOsSPX4-R	AGGGAGCTATAGGTTTGCAG
qOsSPX5-F	GCGCGACCATTTCTCAACTA
qOsSPX5-R	AGGAAGAAGGCGTTGAAC TTG
qOsSPX6-F	AAGGAGCTGAAGCGCATCGT
qOsSPX6-R	AGGAGTCGATCTTGTCGATGTC

附表 2 OsSPX 基因家族的转录组表达数据
Table S2 Transcriptomic expression data for the OsSPX gene family

基因 Gene	高磷 High phosphorus			低磷 Low phosphorus		
	重复 1 Replication 1	重复 2 Replication 2	重复 3 Replication 3	重复 1 Replication 1	重复 2 Replication 2	重复 3 Replication 3
<i>OsSPX1</i>	43.136410	31.516768	43.498970	760.657471	751.231750	723.610413
<i>OsSPX2</i>	22.661093	21.275381	21.853298	109.968208	94.663010	113.422134
<i>OsSPX3</i>	0	0.128173	0.132963	422.991394	473.344635	425.543488
<i>OsSPX4</i>	27.393534	24.097389	24.996458	27.083014	22.188303	24.889666
<i>OsSPX5</i>	3.738686	1.741453	2.510515	869.731812	928.867554	833.532715
<i>OsSPX6</i>	12.914185	7.527859	9.783573	689.889404	798.101257	700.648438

表中高磷和低磷列下分别对应 3 个生物学重复数据。
Values in the high phosphorus and low phosphorus columns represent three biological replications.