

# 紫花苜蓿 $\beta$ -淀粉酶基因家族成员鉴定及其在盐碱胁迫下的表达分析

曲宏宇<sup>#</sup>, 张力爽<sup>#</sup>, 汤雅惠, 刘磊, 郭睿, 郭卫冷, 郭长虹<sup>\*</sup>

哈尔滨师范大学 黑龙江省分子细胞遗传与遗传育种重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150000

曲宏宇, 张力爽, 汤雅惠, 刘磊, 郭睿, 郭卫冷, 郭长虹. 紫花苜蓿  $\beta$ -淀粉酶基因家族成员鉴定及其在盐碱胁迫下的表达分析[J]. 生物工程学报, 2025, 41(2): 719-735.

QU Hongyu, ZHANG Lishuang, TANG Yahui, LIU Lei, GUO Rui, GUO Weileng, GUO Changhong. Identification and expression analysis of  $\beta$ -amylase gene family members in alfalfa under saline-alkali stress[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(2): 719-735.

**摘要:**  $\beta$ -淀粉酶(beta-amylase, BAM)作为水解淀粉的关键酶, 在植物生长发育和抵抗非生物胁迫方面发挥着重要作用。为了挖掘紫花苜蓿(*Medicago sativa* L.)抗盐碱相关的BAM基因, 本研究对紫花苜蓿BAM基因进行全基因组鉴定, 对BAM基因家族成员的理化性质、系统进化、基因结构、保守基序、二级结构、启动子顺式作用元件、染色体定位和基因复制关系进行分析, 利用转录组和实时荧光定量PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR)分析BAM家族在盐碱胁迫下的表达模式。结果表明, 在紫花苜蓿基因组中鉴定出54个BAM基因, 根据系统进化树将其分为8个亚族, 除了第1、7亚族成员之间差异较大外, 其余同一亚族成员之间具有相似的基因结构。保守基序分析显示, 所有MsBAM蛋白均具有典型的糖基水解结构域。染色体定位分析表明,  $\beta$ -淀粉酶基因家族成员不均匀地分布在27条染色体上。基因的片段重复导致了紫花苜蓿BAM基因数目增多。BAM基因启动子中含有大量与植物激素和抗逆性相关的响应元件。转录组和qRT-PCR分析表明, 大部分MsBAM基因响应盐碱胁迫, MsBAM6等28个基因在盐碱胁迫1 d和7 d时均上调表达, MsBAM9等5个基因上调2倍以上。另外, 在盐碱胁迫下, 紫花苜蓿中的 $\beta$ -淀粉酶活性显著增强, 可溶性糖含量显著增加, 表明BAM基因在紫花苜蓿抵御盐碱胁迫方面具有重要的作用。以上结果为进一步研究紫花苜蓿BAM基因抵抗盐碱胁迫的功能奠定了基础。

**关键词:** 紫花苜蓿;  $\beta$ -淀粉酶; 基因家族; 盐碱胁迫

资助项目: 国家自然科学基金(U21A20182); 国家科技攻关项目(2022YFE0203300); 哈尔滨师范大学研究生创新项目(HSDSSCX2024-13)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (U21A20182), the National Key Research and Development Program of China (2022YFE0203300), and the Graduate Student Innovation Fund of Harbin Normal University (HSDSSCX2024-13).

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this work.

<sup>\*</sup>Corresponding author. E-mail: kaku3008@hrbnu.edu.cn

Received: 2024-10-11; Accepted: 2024-12-19; Published online: 2024-12-19

## Identification and expression analysis of $\beta$ -amylase gene family members in alfalfa under saline-alkali stress

QU Hongyu<sup>#</sup>, ZHANG Lishuang<sup>#</sup>, TANG Yahui, LIU Lei, GUO Rui, GUO Weileng, GUO Changhong<sup>\*</sup>

Key Laboratory of Molecular Cytogenetics and Genetic Breeding of Heilongjiang Province, Harbin Normal University, Harbin 150000, Heilongjiang, China

**Abstract:** Beta-amylases (BAMs), key enzymes in starch hydrolysis, play an important role in plant growth, development, and resistance to abiotic stress. To mine the saline-alkali tolerance-related BAM genes in alfalfa (*Medicago sativa* L.), we identified MsBAM genes in the whole genome. The physicochemical properties, phylogeny, gene structures, conserved motifs, secondary structures, promoter *cis*-acting elements, chromosome localization, and gene replication relationships of BAM gene family members were analyzed. RNA-seq and quantitative real-time PCR (qRT-PCR) were employed to analyze the expression patterns of BAM family members under saline-alkali stress. The results showed that 54 BAM genes were identified in the genome, which were classified into 8 subgroups according to the phylogenetic tree. The members of the same subgroup had similar gene structures except that those of subgroups 1 and 7 had large differences. Conserved motif analysis showed that all MsBAM proteins had a typical glycohydrolysis domain. The chromosome localization analysis showed that MsBAM gene family members were unevenly distributed on 27 chromosomes. The duplication of gene segments led to the increase in BAM gene number in alfalfa. The promoters of BAM genes contained a large number of elements in response to plant hormones and stress. Transcriptome data and qRT-PCR results showed that the expression levels of most MsBAM genes were up-regulated in response to saline-alkali stress. Under the saline-alkali stress, the expression levels of 28 genes, including *MsBAM6*, were up-regulated on days 1 and 7, and those of 5 genes, including *MsBAM9*, were up-regulated by over 2 folds. In addition, under salt-alkali stress, BAM activity and soluble sugar content were significantly increased. These results indicate that BAM genes play a key role in alfalfa in response to saline-alkali stress, laying a foundation for further research in this field.

**Keywords:** alfalfa (*Medicago sativa* L.);  $\beta$ -amylase; gene family; saline-alkali stress

盐碱胁迫是对植物生长和产量产生负面影响的重要非生物胁迫<sup>[1-2]</sup>。全球盐碱地面积约为9.54亿hm<sup>2</sup>,其中中国盐碱地面积约为9913万hm<sup>2</sup>,东北地区是中国土地盐碱化最严重的地区之一,也是世界三大盐碱地集中区之一<sup>[3]</sup>。盐碱胁迫由于其高盐度和高碱度,严重抑制了植物正常生长,并影响农业的可持续发展<sup>[4-5]</sup>。土壤

中过多的盐分会使水势降低,植物吸水困难,造成植物生理干旱,引发渗透胁迫<sup>[6]</sup>。植物为了应对盐碱引起的渗透胁迫,会在体内合成相应的渗透调节物质,降低渗透势,提高细胞吸水或保水能力,从而维持细胞膨压及正常生理代谢活动<sup>[7]</sup>。

淀粉作为植物重要的储能物质,是由D-葡

萄糖构成的高聚体<sup>[8]</sup>。在环境胁迫下,淀粉分解后产生的可溶性糖会参与抵御胁迫<sup>[9]</sup>。许多研究表明,糖类物质的积累可以调节渗透压,维持渗透压平衡<sup>[10]</sup>。 $\beta$ -淀粉酶(beta-amylase, BAM)是水解淀粉的关键酶<sup>[11]</sup>, $\beta$ -淀粉酶属于典型的外切水解酶,从葡聚糖链的非还原端依次水解交替的 $\alpha$ -1,4键,产生麦芽糖<sup>[12]</sup>。BAM基因家族广泛存在于真核生物中,响应多种非生物胁迫,参与调控植物的生长发育过程。在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中有9个BAM家族成员,命名为AtBAM1至AtBAM9<sup>[13]</sup>;水稻(*Oryza sativa*)中有10个<sup>[14]</sup>;茶树(*Camellia sinensis*)中有9个<sup>[15]</sup>;高粱(*Sorghum bicolor*)和谷子(*Setaria italica*)中各有10个;二穗短柄草(*Brachypodium distachyon*)有11个;玉米(*Zea mays*)有13个<sup>[16]</sup>;番荔枝(*Annona atemoya*)中有7个<sup>[17]</sup>;木薯(*Cassava*)中有10个BAM家族成员<sup>[18]</sup>等。在拟南芥的9个BAM基因家族成员中,BAM3定位于叶绿体,具有 $\beta$ -淀粉酶生理活性,在淀粉降解中起决定性的作用<sup>[19]</sup>;拟南芥BAM1突变体被发现叶片气孔开放减少,植物的耐旱性提高<sup>[20]</sup>;拟南芥BAM8被发现可以增加麦芽糖的积累和提高植物抗寒能力<sup>[21]</sup>;IbBAM1.1基因在甘薯(*Ipomoea batatas*)中被盐胁迫和干旱胁迫显著诱导,与野生型(WT)相比,IbBAM1.1在拟南芥中的过表达增强了对盐和干旱胁迫的耐受性<sup>[22]</sup>。白梨(*Pyrus betulaefolia*)中PbrBAM3基因受到低温和干旱胁迫的强烈诱导,过表达PbrBAM3提高了烟草的 $\beta$ -淀粉酶活性,增加了麦芽糖含量和总可溶性糖含量,过表达PbrBAM3的烟草具有更好的抗逆性<sup>[23]</sup>。尽管已经发现BAM在植物抵抗干旱、低温、盐等非生物胁迫过程中起着重要的作用,但关于BAM在盐碱胁迫下的响应还鲜有报道。

紫花苜蓿是多年生豆科牧草,蛋白质含量

高、适应性强、适口性好,被称为“牧草之王”<sup>[24]</sup>。紫花苜蓿根系发达,可与土壤中的根瘤菌形成固氮共生,固定空气中的游离氮,提高土壤肥力,具有涵养土壤和改良退化土壤的生态功能<sup>[25]</sup>。为了开发盐碱地资源,缓解与粮食作物争地的矛盾,紫花苜蓿往往种植在盐碱地上,土地的盐碱化限制了植物对水分和养分的吸收,严重影响了紫花苜蓿的产量和品质<sup>[26]</sup>。为了挖掘与紫花苜蓿抗盐碱相关的基因,本研究利用生物信息学方法鉴定紫花苜蓿BAM基因家族,分析其进化关系、基因结构、保守基序和顺式调控元件,进一步利用转录组数据和qRT-PCR分析盐碱胁迫下BAM基因家族的表达模式,测定盐碱胁迫下紫花苜蓿 $\beta$ -淀粉酶活性,以期为进一步研究紫花苜蓿BAM基因的耐盐碱功能提供理论依据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 植物材料及处理

选取4周龄紫花苜蓿(基质为蛭石和营养土1:1混合),浇灌100 mmol/L NaHCO<sub>3</sub>和Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(比例为1:2)盐碱液模拟盐碱胁迫,1 d和7 d进行整株取材,每个处理均设置3次生物学重复。样品采集后进行液氮速冻,置于-80 °C冻存储备用。

### 1.2 紫花苜蓿基因组中MsBAM家族基因鉴定及基本理化性质分析

在NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中下载紫花苜蓿全基因组蛋白序列文件和gff3文件构建本地BLAST数据库,使用Pfam (<http://www.pfam.xfam.org/>)下载了BAM蛋白保守域(PF01373)文件,在紫花苜蓿的基因组中进行筛选,并根据是否含有保守结构域(Glyco\_hydro\_14domain)对其进行鉴定。利用TBtools工具筛选出核酸文件与蛋白文件,运用perl程序筛选

出基因注释文件。在 ExPASy ([https://web.expasy.org/compute\\_pi](https://web.expasy.org/compute_pi))里得到氨基酸数目、相对分子量、不稳定系数、脂肪系数、亲水性和等电点。利用 PredictProtein (<https://predictprotein.org/>) 预测 BAM 蛋白的亚细胞定位。

### 1.3 MsBAM 基因家族的系统进化树分析

使用筛选出的蛋白文件, 鉴定出的所有蛋白序列用 ClustalW 的默认设置进行对齐, 之后使用 MEGA 11.0 工具邻接(neighbor joining, NJ)法进行系统发育树构建。进行 1 000 次 bootstrap 抽样, 其他参数为默认值, 构建系统进化树。

### 1.4 MsBAM 基因家族保守基序及基因结构分析

利用 MEME 在线工具(<http://meme-suite.org/tools/meme>)对 MsBAM 基因家族的保守基序进行识别, 设置最多 10 个基序。采用 TBtools 软件对保守基序可视化分析。利用 GSDS 网站(<http://gsds.cbi.pku.edu.cn>)在线分析紫花苜蓿 BAM 基因结构, 采用 TBtools 软件进行基因结构可视化分析。

### 1.5 MsBAM 基因家族二级结构及启动子顺式作用元件预测

利用 PredictProtein (<https://predictprotein.org/>) 预测 MsBAM 蛋白的二级结构。提取 MsBAM 家族基因起始密码子上游 2 000 bp 的序列。使用 PlantCARE 数据库(<http://bioinformatics.psych.ugent.be/webtools/plantcare/html>)分析 MsBAM 家族基因启动子顺式作用元件, 利用 TBtools 软件进行结果图制作。

### 1.6 MsBAM 基因家族染色体定位及基因复制关系分析

利用在线网站 MG2C ([http://mg2c.iask.in/mg2c\\_v2.1/](http://mg2c.iask.in/mg2c_v2.1/))进行染色体定位图片的绘制, 使用 BLASTp、OrthoMCL 和 MCScanX 的默认参数

分析基因复制事件, 运用本地 BLAST 命令得到基因的复制关系, 删除低于 75%的数据以及重复的数据, 并将基因名替换成所在染色体的名, 运用 TBtools 软件中的 Basic Circos 得到基因复制关系, 并对结果进行绘制。

### 1.7 RNA 提取及基因表达分析

根据本课题组先前研究中获得的紫花苜蓿在盐碱胁迫下的转录组数据<sup>[27]</sup>, 分析了 BAM 基因的表达情况。使用 RNAPrep Pure Plant Kit (Tiangen 公司)提取 RNA。将提取出的总 RNA 作为模板, 利用 EasyScript One-Step gDNA Removal cDNA 和 Synthesis SuperMix Kit (TransGen Biotech 公司)反转录获得 cDNA。定量引物使用 Primer Premier 5 设计(<http://www.Premier-Biosoft.com>) (表 1)。使用 *MsGAPDH* 作为参考引物, 合成终产物稀释 5 倍后用作模板, 在 CFX96 Optics Module 实时定量 PCR 仪上进行 qRT-PCR 分析。采用 SYBR Premix *Ex Taq* (TaKaRa 公司)试剂根据要求进行 20  $\mu$ L 定量反应, 反应均为 3 次重复, 并使用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  方法计算基因的相对表达量。

### 1.8 $\beta$ -淀粉酶活力的测定

紫花苜蓿整株鲜样材料磨样, 称取研磨样品约 1.0 g, 制备淀粉酶原液和相应的淀粉酶稀释液, 绘制麦芽糖标准曲线, 采用 3,5-二硝基水杨酸提取法<sup>[28]</sup>测定  $\beta$ -淀粉酶活力, 进行 3 次生物学重复。

## 2 结果与分析

### 2.1 MsBAM 家族基因鉴定及基本理化性质分析

在紫花苜蓿基因组中鉴定出 54 个 MsBAM 基因, 根据其在染色体上的相对位置, 将紫花苜蓿 BAM 基因家族成员分别命名为 *MsBAM1*-

表 1 紫花苜蓿 MsBAM 基因家族成员的 qRT-PCR 引物序列信息

Table 1 qRT-PCR primers for MsBAM gene family members

Gene	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
<i>MsBAM6</i>	TTGAGGTAGGACTTGGCC	GATATCTGGCCTCACTAATCC
<i>MsBAM9</i>	CCCGAGTTGCTACTTTTCG	GGCTCATAACCGCAGATT
<i>MsBAM15</i>	TGTGGAGGAAATGTAGGGG	TCACTGTATATCTCAATGGCTGT
<i>MsBAM20</i>	CTCCCACTCGGAGTTATTA	CCCCTACATTTCTCCACA
<i>MsBAM30</i>	GACTCTTGCAGCATACT	TGCCCAAATAATCTGTGAAT
<i>MsBAM41</i>	GGGAGAAGCCAGGTGAGT	CATTGAACTGGACTTCTGCC
<i>MsBAM43</i>	TGGCTACCTTCCAATCGC	ACGCCTTCAATATCTGTTTCG
<i>MsBAM48</i>	GCGATTAGTTTGGCAAGT	AGTTTGGTCGTTCCATCAG
<i>MsBAM54</i>	AGATCAGCAAGAACCCTGAC	TTGTATTTCCGAGATGACACT
<i>MsGAPDH</i>	ACGAGCGTTTCAGATG	ACCTCCGATCCAGACA

*MsBAM54* (表 2)。BAM 属于糖苷水解酶家族, 它含有 1 个保守结构域 Glyco\_hydro\_14。预测结果显示, MsBAM 蛋白的氨基酸数目从 59 aa 到 1 641 aa 不等, 相对分子质量最小 6.49 kDa (*MsBAM5*), 最大 182.86 kDa (*MsBAM35*)。所有 MsBAMs 蛋白的等电点都在 5.00 以上, 不稳定系数小于 40.00 的 BAM 家族成员有 36 个, 大部分为稳定蛋白。脂肪系数从 20.00 到 131.86 不等, 平均脂肪系数为 80.90。亚细胞定位预测发现, MsBAM 蛋白有 43 个定位在叶绿体, 3 个定位在细胞核, 8 个定位在细胞质。

## 2.2 系统进化树分析

对 MsBAM 基因家族系统进化关系进行分析, 根据序列长度和基因结构, 将 54 个 MsBAM 家族成员分成 8 个亚族(图 1)。其中 I 亚家族成员最多, 有 21 个, 说明 I 亚族可能为 MsBAM 基因家族中最重要的亚族, 亚族 II、III、IV、V 和 VI 分别包含 4 个家族成员, 其中 II 亚族与其他亚族在基因结构上有很大差别。

## 2.3 保守基序及基因结构分析

在紫花苜蓿 MsBAM 基因家族中共鉴定了 10 个保守基序(图 2A)。同一亚族 MsBAM 成员

具有相似的序列长度和保守的基序组成, I 亚族成员众多, 其中 *MsBAM40* 长度最长, 但是 motif 分布跟同亚族成员相似, 而 *MsBAM25* 在同族中最短, 只含有 motif 1、4、5、7、9, *MsBAM24* 跟同亚族相比, N 端缺少 motif 1、4、5、7、9, 而 *MsBAM38* 在 C 端缺少 motif 6 和 motif 10。II 亚族只包含 motif 1, 并且长度最短。亚族 III、IV、V 和 VI 各成员之间含有相同数量的 motif, 分别是 10、8、11、12 个。VII 亚族中 *MsBAM11* 的长度与同组相差较大, 但是 6 个成员 motif 分布十分相似, 其中 *MsBAM7* 和 *MsBAM11* 比同族多了 1 个 motif 9。VIII 亚族含有 motif 2、motif 3 和 motif 5。

对 MsBAM 基因家族外显子和内含子进行了分析(图 2B)。亚族 I 的外显子数量和分布较复杂, *MsBAM24* 和 *MsBAM25* 数量最少, 仅有 2 个, 而 *MsBAM40* 有 17 个。II 亚族中序列最短的 *MsBAM5*、*MsBAM12*、*MsBAM21* 和 *MsBAM27* 都只含有 1 个外显子, 亚族 III 和 IV 分别含有 4 个和 3 个外显子。VI 亚族中的 *MsBAM48* 含有最多的外显子, 数量为 26 个。VII 亚族中 *MsBAM15*、*MsBAM16*、*MsBAM18* 和 *MsBAM20* 的外显子分布基本相同。

表 2 紫花苜蓿 MsBAM 基因家族成员特征

Table 2 Characteristics of MsBAM gene family members

Gene name	Gene ID	Chromosome	Number of amino acid	Molecular weight (kDa)	pI	Instability index	Aliphatic index	GRAVY	Subcellular localization
<i>MsBAM1</i>	MS.gene33037.t1	Chr1.1	313	35.23	8.13	41.29	87.25	-0.363	Nucleus
<i>MsBAM2</i>	MS.gene005433.t1	Chr1.1	267	30.63	8.50	45.70	87.68	-0.327	Nucleus
<i>MsBAM3</i>	MS.gene034585.t1	Chr1.3	236	26.82	8.62	29.44	99.15	0.133	Cytoplasm
<i>MsBAM4</i>	MS.gene034586.t1	Chr1.3	236	26.82	8.81	29.40	100.38	0.148	Cytoplasm
<i>MsBAM5</i>	MS.gene052838.t1	Chr1.4	59	6.49	7.92	27.09	130.17	0.964	Chloroplast
<i>MsBAM6</i>	MS.gene54879.t1	Chr2.1	286	32.18	8.65	43.51	82.20	-0.393	Nucleus
<i>MsBAM7</i>	MS.gene35779.t1	Chr2.1	591	67.41	5.84	40.78	77.73	-0.417	Cytoplasm
<i>MsBAM8</i>	MS.gene002783.t1	Chr2.1	518	56.75	5.82	40.82	76.02	-0.270	Chloroplast
<i>MsBAM9</i>	MS.gene96196.t1	Chr2.2	535	58.62	6.25	41.63	74.15	-0.314	Chloroplast
<i>MsBAM10</i>	MS.gene00981.t1	Chr2.3	535	58.59	6.25	41.02	74.15	-0.313	Chloroplast
<i>MsBAM11</i>	MS.gene029032.t1	Chr2.4	1 399	157.56	6.54	45.58	78.08	-0.525	Cytoplasm
<i>MsBAM12</i>	MS.gene73337.t1	Chr2.4	59	6.57	7.92	30.10	131.86	1.058	Chloroplast
<i>MsBAM13</i>	MS.gene004469.t1	Chr2.4	518	56.75	5.82	40.82	76.02	-0.270	Chloroplast
<i>MsBAM14</i>	MS.gene048964.t1	Chr4.1	548	62.38	8.95	46.60	72.59	-0.327	Chloroplast
<i>MsBAM15</i>	MS.gene51367.t1	Chr4.1	479	54.10	5.27	37.06	79.39	-0.466	Cytoplasm
<i>MsBAM16</i>	MS.gene027467.t1	Chr4.2	496	56.10	5.33	39.56	80.58	-0.443	Cytoplasm
<i>MsBAM17</i>	MS.gene55830.t1	Chr4.3	548	62.38	8.95	46.60	72.59	-0.327	Chloroplast
<i>MsBAM18</i>	MS.gene001813.t1	Chr4.3	496	56.04	5.27	37.11	80.79	-0.434	Cytoplasm
<i>MsBAM19</i>	MS.gene20208.t1	Chr4.4	548	62.45	9.02	46.54	73.30	-0.324	Chloroplast
<i>MsBAM20</i>	MS.gene000320.t1	Chr4.4	496	56.19	5.41	38.41	80.58	-0.453	Cytoplasm
<i>MsBAM21</i>	MS.gene21217.t1	Chr5.1	59	6.58	6.53	24.06	113.73	0.778	Chloroplast
<i>MsBAM22</i>	MS.gene54200.t1	Chr5.1	543	60.68	6.45	31.67	75.58	-0.369	Chloroplast
<i>MsBAM23</i>	MS.gene54201.t1	Chr5.1	496	55.60	6.04	34.38	74.88	-0.393	Chloroplast
<i>MsBAM24</i>	MS.gene54202.t1	Chr5.1	302	33.79	5.78	35.74	69.80	-0.408	Chloroplast
<i>MsBAM25</i>	MS.gene54203.t1	Chr5.1	154	17.47	5.65	29.62	91.62	0.003	Chloroplast
<i>MsBAM26</i>	MS.gene72780.t1	Chr5.1	1 641	182.75	6.14	38.17	91.05	-0.202	Chloroplast
<i>MsBAM27</i>	MS.gene56994.t1	Chr5.1	59	6.62	7.94	21.77	121.86	0.939	Chloroplast
<i>MsBAM28</i>	MS.gene09696.t1	Chr5.2	494	55.31	5.82	31.70	74.19	-0.379	Chloroplast
<i>MsBAM29</i>	MS.gene09695.t1	Chr5.2	543	60.97	7.97	33.49	77.02	-0.388	Chloroplast
<i>MsBAM30</i>	MS.gene09694.t1	Chr5.2	496	55.63	6.26	31.69	74.88	-0.411	Chloroplast
<i>MsBAM31</i>	MS.gene82151.t1	Chr5.2	1 641	182.81	6.12	37.87	91.17	-0.202	Chloroplast
<i>MsBAM32</i>	MS.gene21509.t1	Chr5.3	494	55.31	5.82	32.44	75.18	-0.374	Chloroplast
<i>MsBAM33</i>	MS.gene21508.t1	Chr5.3	496	55.54	6.14	32.71	75.67	-0.387	Chloroplast
<i>MsBAM34</i>	MS.gene21506.t1	Chr5.3	498	55.85	6.08	32.69	74.78	-0.400	Chloroplast
<i>MsBAM35</i>	MS.gene028139.t1	Chr5.3	1 641	182.86	6.14	37.90	91.35	-0.198	Chloroplast
<i>MsBAM36</i>	MS.gene015359.t1	Chr5.4	494	55.29	5.82	32.27	74.98	-0.379	Chloroplast
<i>MsBAM37</i>	MS.gene015358.t1	Chr5.4	496	55.63	6.13	34.55	75.67	-0.391	Chloroplast
<i>MsBAM38</i>	MS.gene015350.t1	Chr5.4	387	43.50	5.91	34.61	76.80	-0.396	Chloroplast
<i>MsBAM39</i>	MS.gene83456.t1	Chr5.4	1 641	182.75	6.05	37.46	91.24	-0.197	Chloroplast
<i>MsBAM40</i>	MS.gene069657.t1	Chr6.1	1 271	143.00	7.29	39.58	86.06	-0.152	Chloroplast

(待续)

(续表 2)

Gene name	Gene ID	Chromosome	Number of amino acid	Molecular weight (kDa)	pI	Instability index	Aliphatic index	GRAVY	Subcellular localization
<i>MsBAM41</i>	MS.gene40443.t1	Chr6.2	573	63.82	5.75	34.72	68.45	-0.408	Chloroplast
<i>MsBAM42</i>	MS.gene041698.t1	Chr6.3	573	63.78	5.68	33.36	67.77	-0.425	Chloroplast
<i>MsBAM43</i>	MS.gene27372.t1	Chr6.4	578	64.40	5.75	34.49	67.01	-0.428	Chloroplast
<i>MsBAM44</i>	MS.gene023885.t1	Chr7.1	658	73.83	6.13	47.77	74.67	-0.397	Chloroplast
<i>MsBAM45</i>	MS.gene069036.t1	Chr7.2	263	29.48	8.72	38.32	82.70	-0.391	Chloroplast
<i>MsBAM46</i>	MS.gene27744.t1	Chr7.3	625	69.94	6.14	47.51	74.40	-0.391	Chloroplast
<i>MsBAM47</i>	MS.gene27743.t1	Chr7.3	658	73.76	6.05	48.06	74.67	-0.392	Chloroplast
<i>MsBAM48</i>	MS.gene52251.t1	Chr7.4	1 069	120.14	6.67	42.80	81.63	-0.312	Chloroplast
<i>MsBAM49</i>	MS.gene011612.t1	Chr8.1	546	61.20	7.00	40.11	70.33	-0.441	Chloroplast
<i>MsBAM50</i>	MS.gene70005.t1	Chr8.1	179	20.47	6.43	39.14	85.53	-0.251	Chloroplast
<i>MsBAM51</i>	MS.gene61247.t1	Chr8.2	547	61.33	7.27	39.70	70.20	-0.447	Chloroplast
<i>MsBAM52</i>	MS.gene061113.t1	Chr8.3	375	28.34	5.39	24.97	20.00	-0.207	Chloroplast
<i>MsBAM53</i>	MS.gene72386.t1	Chr8.3	547	61.31	7.00	40.41	69.49	-0.446	Chloroplast
<i>MsBAM54</i>	MS.gene46383.t1	Chr8.4	546	61.21	7.00	39.41	69.43	-0.446	Chloroplast

GRAVY: Grand average of hydrophaticity.

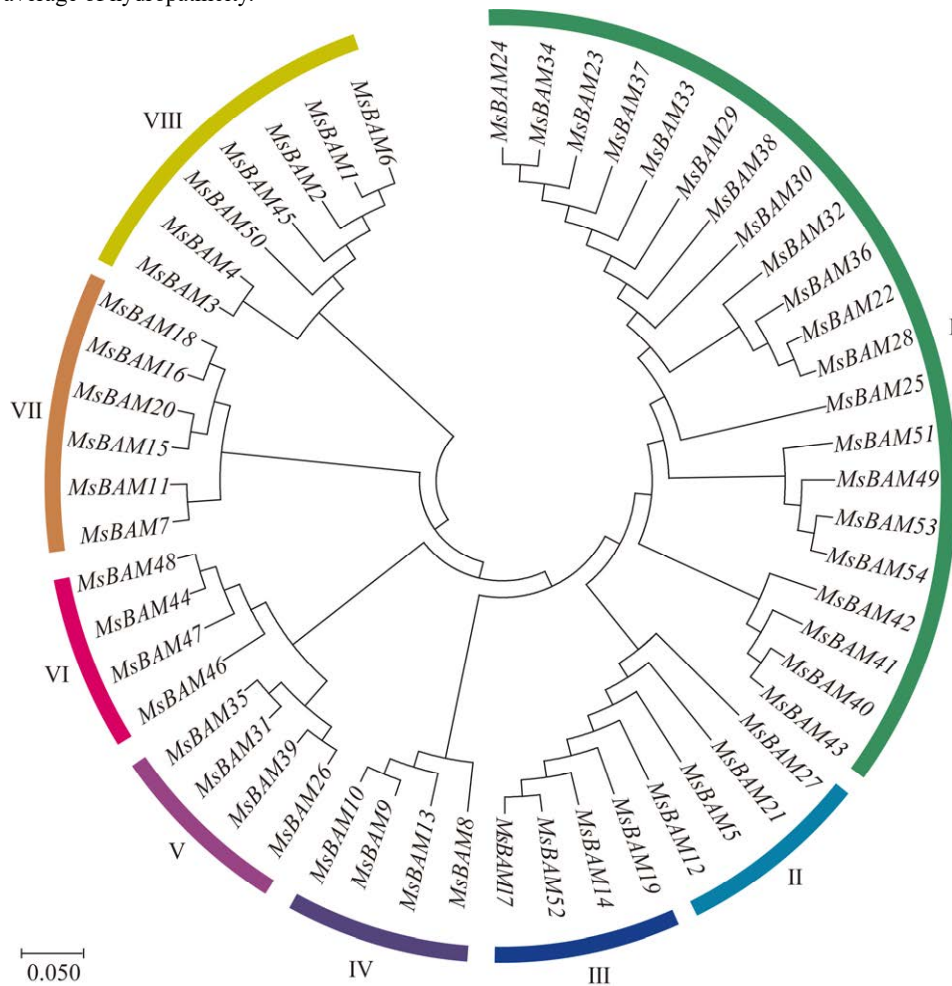


图 1 紫花苜蓿 MsBAM 基因家族成员的系统发育进化树  
Figure 1 Phylogenetic trees of MsBAM gene family members.



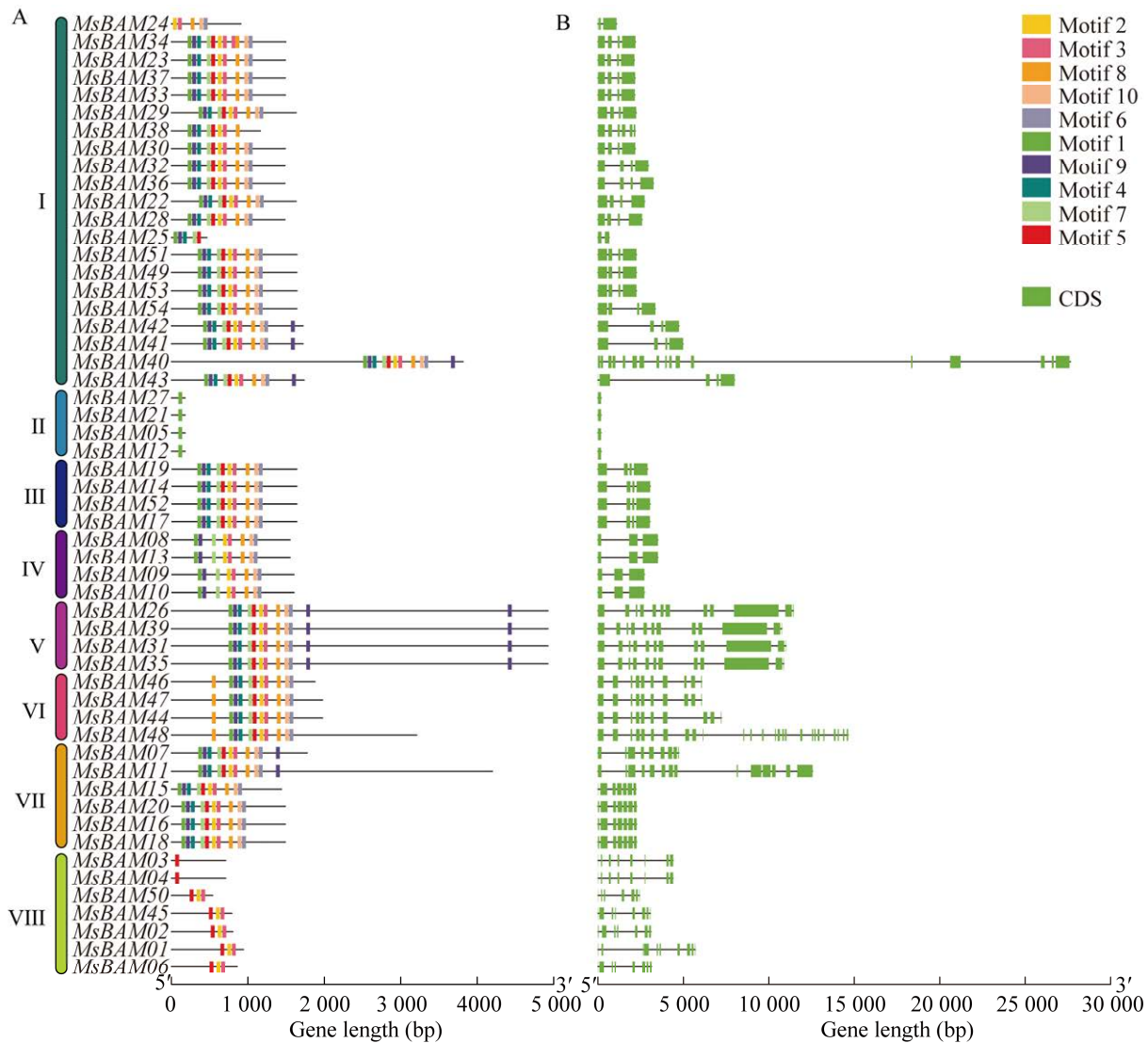


图2 紫花苜蓿 MsBAM 基因家族成员的保守基序(A)和基因结构(B)

Figure 2 Conserved motifs (A) and gene structure (B) of MsBAM gene family members. CDS: Coding sequence.

## 2.4 二级结构及启动子顺式作用元件分析

MsBAM 蛋白二级结构的预测结果显示, 54 个 MsBAM 蛋白的二级结构均存在  $\alpha$ -螺旋(alpha helix)和  $\beta$ -折叠(beta sheet) (表 3)。其中,  $\alpha$ -螺旋所占比例为 10.48%–44.19%,  $\beta$ -折叠所占比例相对较小, 为 4.12%–21.77%, 可以看出  $\alpha$ -螺旋是 MsBAM 蛋白结构的主要组成部分。

分析了 54 个 MsBAM 基因上游 2 000 bp 的

DNA 序列, 确定了潜在的顺式作用元件(图 3)。在这些作用元件中, 与胁迫相关元件共有 5 种, 分别是伤口、干旱、低温、防御和应激, 以及厌氧诱导响应元件; 与激素反应相关的顺式作用元件有 4 种, 包括脱落酸、生长素、赤霉素和水杨酸响应元件。

## 2.5 染色体定位及基因复制关系分析

紫花苜蓿有 32 条染色体, 对 MsBAM 基因在染色体上的定位进行分析(图 4), 发现 54 个



MsBAM 基因成员不均匀分布在 27 条染色体上, 在 Chr1.2、Chr3.1、Chr3.2、Chr3.3 和 Chr3.4 这 5 条染色体上没有该基因家族的分布。Chr1.4、Chr2.2、Chr2.3、Chr4.2、Chr6.1、Chr6.2、Chr6.3、Chr6.4、Chr7.1、Chr7.2、Chr7.4、Chr8.2 和 Chr8.4 这 13 条染色体都只含有 1 个家族成员, 而 Chr5.1 含有最多的家族成员, 有 7 个, 分别为 *MsBAM20*–*MsBAM27*。

分析 MsBAM 基因的复制关系发现(图 5), 54 个 MsBAM 基因成员共有 219 条基因复制关系, 包括片段重复和串联重复, 串联重复有 12 条, Chr5.1 含有 5 条串联重复, Chr5.2 含有 3 条串联重复, Chr1.3、Chr5.3、Chr5.4 和 Chr7.3 各含有 1 条串联重复, 其余 207 条均为片段重复, 由于 Chr5.1 含有最多的家族成员, 基因复制关系也最为复杂, 这条染色体上就有 61 条基因复制关系, 其中 *MsBAM22* 和 *MsBAM23* 各有 14 条复制关系, 也是家族成员中复制关系最多的。

表 3 紫花苜蓿 MsBAM 基因家族成员的二级结构组成

Table 3 Secondary structure of MsBAM gene family members

Protein	Alpha helix (%)	Beta sheet (%)	Others (%)
MsBAM1	31.31	4.47	64.22
MsBAM2	44.19	4.12	51.69
MsBAM3	28.81	20.34	50.85
MsBAM4	26.69	19.49	53.82
MsBAM5	38.98	6.78	54.24
MsBAM6	29.02	5.94	65.04
MsBAM7	27.24	12.35	60.41
MsBAM8	26.26	17.95	55.79
MsBAM9	25.05	19.44	55.51
MsBAM10	25.42	19.25	55.33
MsBAM11	27.88	7.51	64.61
MsBAM12	40.68	6.78	52.54
MsBAM13	26.25	17.95	55.80

(待续)

(续表 3)

Protein	Alpha helix (%)	Beta sheet (%)	Others (%)
MsBAM14	25.18	13.69	61.13
MsBAM15	30.27	12.11	57.62
MsBAM16	28.23	12.90	58.87
MsBAM17	25.18	13.69	61.13
MsBAM18	28.43	13.71	57.86
MsBAM19	25.00	13.87	61.13
MsBAM20	29.03	12.90	58.07
MsBAM21	37.29	6.78	55.93
MsBAM22	26.52	12.34	61.14
MsBAM23	27.82	13.51	58.67
MsBAM24	25.50	10.26	64.24
MsBAM25	27.27	21.43	51.30
MsBAM26	17.73	19.56	62.71
MsBAM27	20.34	20.34	59.32
MsBAM28	28.95	12.75	58.30
MsBAM29	25.05	12.89	62.06
MsBAM30	26.61	13.51	59.88
MsBAM31	17.49	20.05	62.46
MsBAM32	28.95	14.98	56.07
MsBAM33	29.03	14.11	56.86
MsBAM34	29.32	14.26	56.42
MsBAM35	17.79	20.23	61.98
MsBAM36	28.14	14.98	56.88
MsBAM37	28.43	13.71	57.86
MsBAM38	25.58	14.47	59.95
MsBAM39	17.61	19.80	62.59
MsBAM40	29.98	11.41	58.61
MsBAM41	26.53	10.99	62.48
MsBAM42	24.96	11.87	63.17
MsBAM43	24.57	11.76	63.67
MsBAM44	26.31	11.69	62.00
MsBAM45	30.42	9.51	60.07
MsBAM46	24.16	12.48	63.36
MsBAM47	24.62	13.23	62.15
MsBAM48	21.14	16.46	62.40
MsBAM49	24.73	12.27	63.00
MsBAM50	29.61	9.50	60.89
MsBAM51	24.50	12.61	62.89
MsBAM52	10.48	21.77	67.75
MsBAM53	26.14	12.25	61.61
MsBAM54	24.54	11.72	63.74

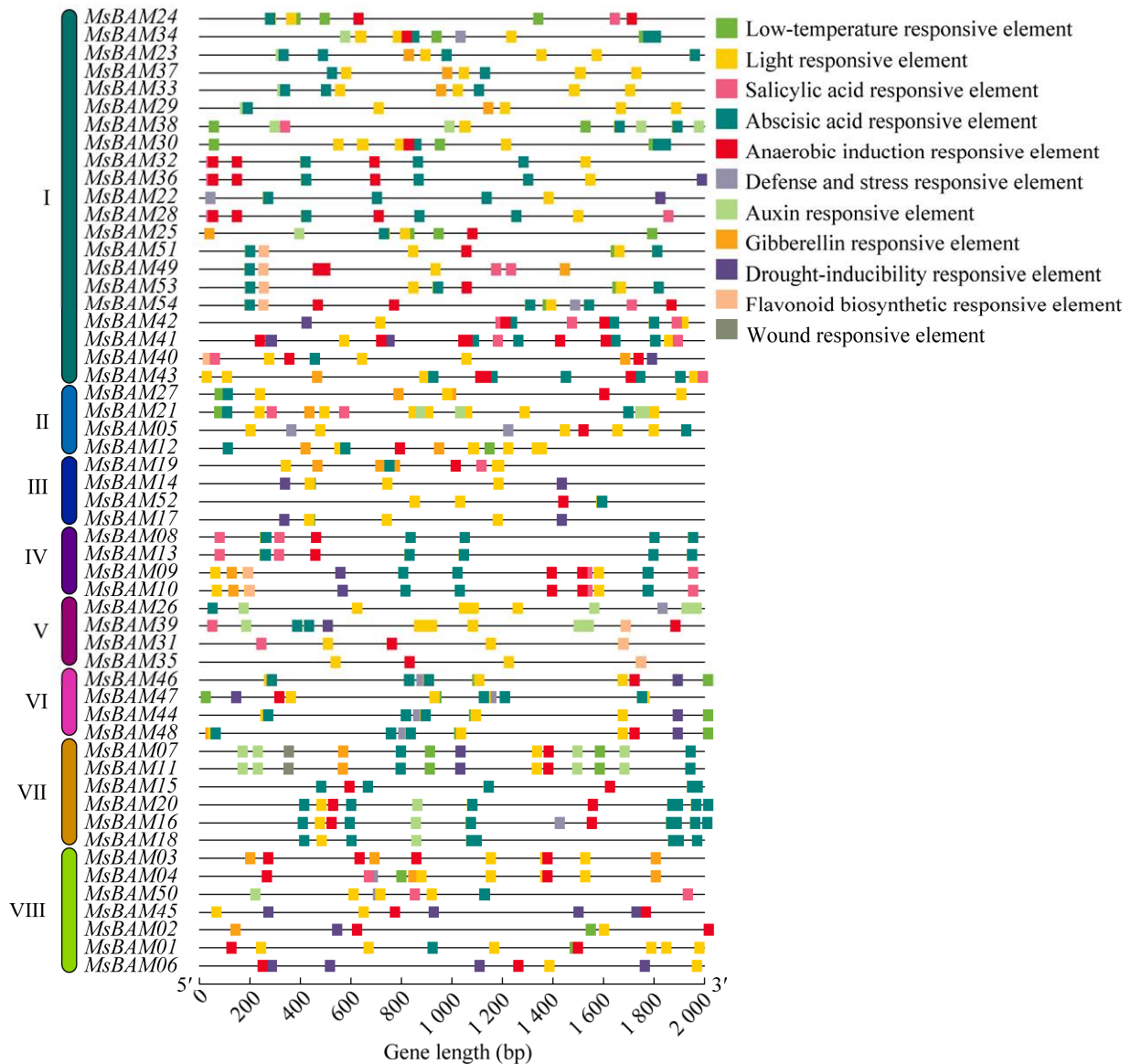


图3 紫花苜蓿 MsBAM 基因家族成员的启动子顺式作用元件

Figure 3 *cis*-acting elements in promoters of MsBAM gene family members.

## 2.6 盐碱胁迫下的表达分析

基于转录组数据,分析了盐碱胁迫下紫花苜蓿 MsBAM 基因的表达情况(图6)。结果表明,39 个 BAM 基因(占 72.22%)响应盐碱胁迫, MsBAM6、MsBAM7、MsBAM9 等 28 个家族成员(占 51.85%)在盐碱胁迫 1 d 和 7 d 时均上调表达, MsBAM9、MsBAM41、MsBAM43、MsBAM48 和 MsBAM54 在胁迫 1 d 和 7 d 时均上调 2 倍以

上, MsBAM43 在 7 d 时上调 56 倍。MsBAM15、MsBAM16、MsBAM18 和 MsBAM20 在胁迫 1 d 时下调, 7 d 时上调; MsBAM22 和 MsBAM51 在胁迫 1 d 时上调, 7 d 时下调。仅有 MsBAM26、MsBAM32、MsBAM34 等 5 个家族成员(占 9.25%)在盐碱胁迫 1 d 和 7 d 时均下调表达。选取 9 个 MsBAM 基因进行 qRT-PCR 分析(图 7), 结果与转录组的基因表达趋势一致。

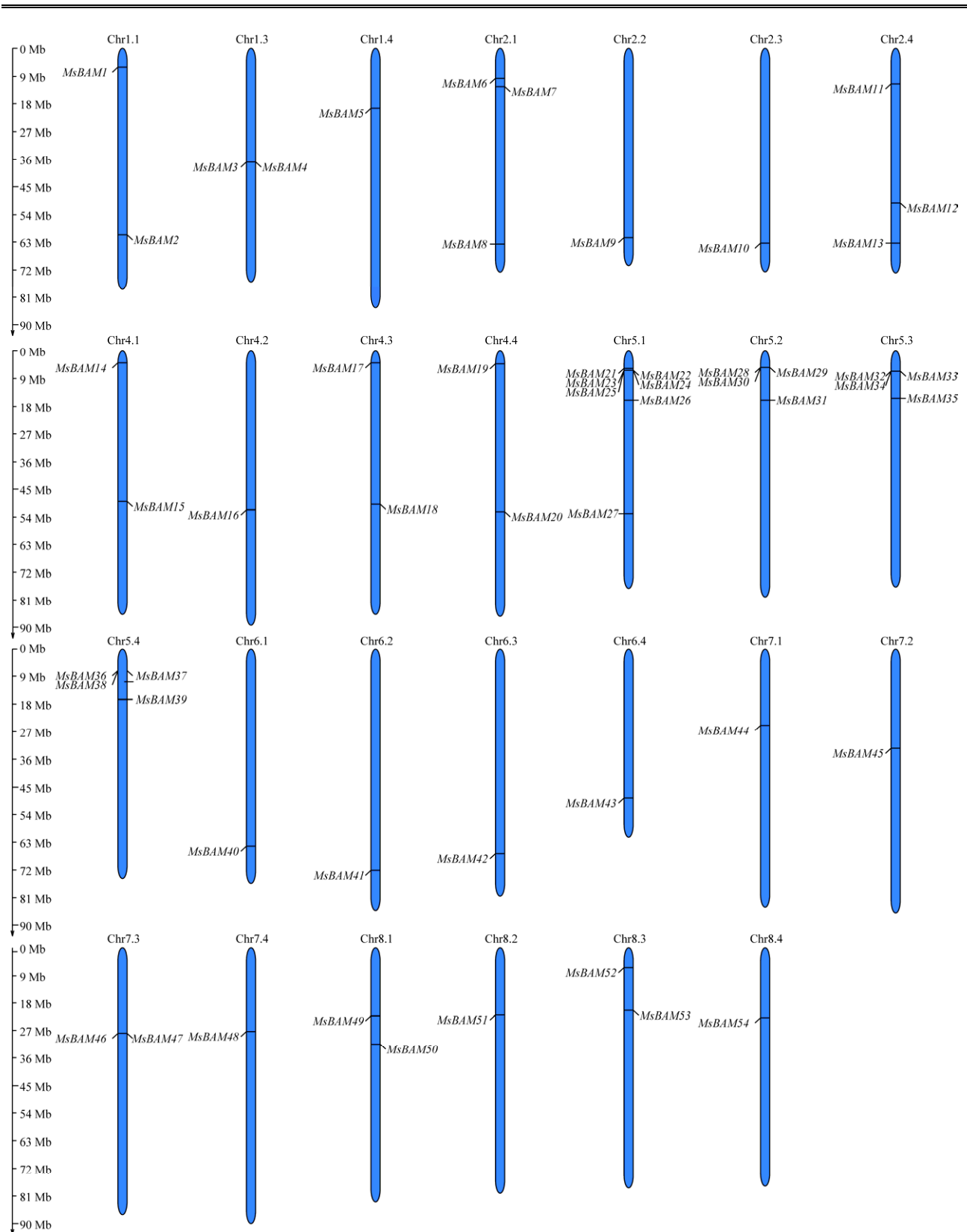


图 4 紫花苜蓿 MsBAM 基因家族成员的染色体定位

Figure 4 Chromosome location of MsBAM gene family members.

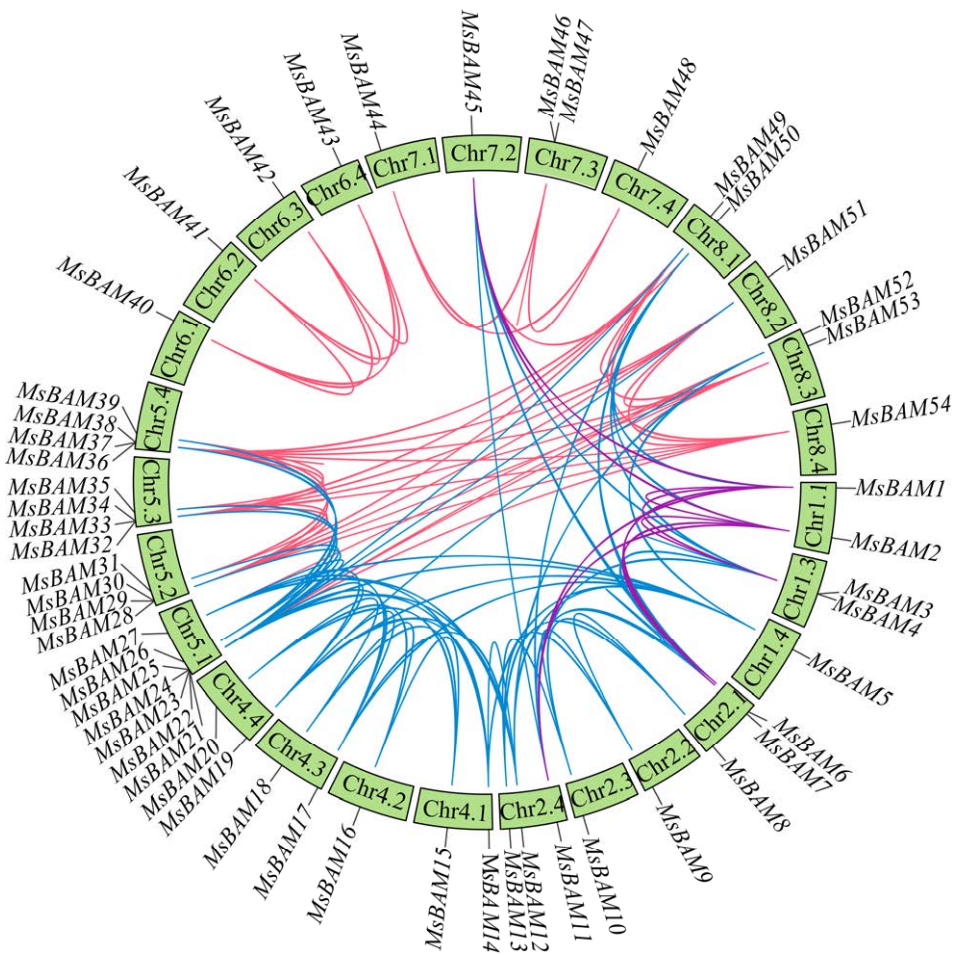


图5 紫花苜蓿 MsBAM 基因家族成员的基因复制关系

Figure 5 Intergenomic synteny relationship of MsBAM gene family members.

## 2.7 $\beta$ -淀粉酶活力测定分析

对紫花苜蓿  $\beta$ -淀粉酶的活性进行了测定(图8)。结果表明,在盐碱胁迫下, $\beta$ -淀粉酶的活性与对照组相比显著提高,在胁迫1 d和7 d时分别提高了2.1倍和2.4倍。

## 3 讨论与结论

淀粉是最丰富的储存能量的碳水化合物,也是叶绿体光合作用的主要产物<sup>[29]</sup>。 $\beta$ -淀粉酶是介导植物叶片中淀粉水解的关键酶,它能够将淀粉分解为可溶性糖,调节胁迫下植物细胞内的渗透势,从而维持植物的生理代谢活动,在植物的生长发育与抗逆过程中发挥着重要的作用。

本研究在紫花苜蓿全基因组中鉴定出54个BAM基因。根据序列比对和基因结构分析,将MsBAM基因家族划分为8个亚族,其中I亚族的MsBAM22、MsBAM23、MsBAM24和MsBAM25定位在Chr5.1。同为一个亚族中的家族成员定位在同一条染色体上的情况非常常见,白梨(*Pyrus bretschneideri*)中位于同一亚族的4个PbBAM以及藜麦(*Chenopodium quinoa*)中位于同一亚族的4个CqBAM都是定位在同一染色体上<sup>[30]</sup>。紫花苜蓿MsBAM基因家族包含1到26个外显子,大部分亚族中的MsBAM家族成员的基因长度,外显子数量和保守基序基本一致,比如V族中4个成员均含有12个外显子,并



且外显子分布基本一致,在白三叶(*Trifolium repens*)<sup>[31]</sup>和枳(*Poncirus trifoliata*)<sup>[32]</sup>中也有相同的情况。但位于I亚族的 *MsBAM40*, 基因长度大约是同亚族的其他成员的 2 倍, 同一亚族成员之间基因长度和结构差异较大的情况在其他物种中也曾发现, 比如, 陆地棉花(*Gossypium hirsutum*)中位于第三亚族的 *GhBAM19* 长度是同亚族其他成员的 1/9, 且只含有 1 个保守基序<sup>[33]</sup>; 红枣(*Ziziphus jujuba* Mill.)中位于第一亚族的 *ZjBAM8* 的基因长度与同亚组的其他 3 个成员相比差别很大<sup>[34]</sup>。紫花苜蓿 BAM 的家族成员较多, 这可能与紫花苜蓿物种的四倍体特性和基因的染色体片段重复有关。在四倍体海岛棉花(*Gossypium barbadense*)中, 51 个 GbBAM 家族成员分布在 21 条染色体上, 由于染色体片段重复导致 GbBAM 家族成员众多。研究表明, 染色体上基因之间的片段重复有助于基因家族成员的扩增<sup>[35]</sup>。本研究中, 54 个 MsBAM 基因家族成员分布在 27 条染色体上, 基因复制关系 95% 都为染色体片段重复, 这与海岛棉花中 BAM 基因家族成员复制关系一致。

紫花苜蓿 MsBAM 基因的启动子中包含较多脱落酸(abscisic acid, ABA)响应元件, ABA 是植物体内重要的胁迫激素<sup>[36]</sup>, 而且 ABA 还可能参与  $\beta$ -淀粉酶水解淀粉的过程。在筛选栽培种板栗(*Castanea mollissima*)萌发过程的关键基因中, 脱落酸合成基因下调,  $\beta$ -淀粉酶合成基因上调, 激素和酶活性分析表明, 栽培种子内源 ABA 表达水平降低,  $\beta$ -淀粉酶活性增强<sup>[37]</sup>。在干旱胁迫下, 枳(*Poncirus trifoliata*)中 ABA 表达水平提高, 诱导 *PtrBAM3* 的上游转录因子发挥作用, 使 *PtrBAM3* 的转录水平显著提高<sup>[38]</sup>。这些结果揭示了 BAM 基因参与淀粉的降解, 并且受到 ABA 的调节。除了 ABA 响应元件之外, 紫花苜蓿 MsBAM 基因的启动子中

还包含较多水杨酸(salicylic acid, SA)和赤霉素(gibberellin, GA)响应元件。研究表明, 在盐碱胁迫下, SA 能够通过调节渗透平衡、增强抗氧化防御系统、调控物质代谢等方式提高植物的耐盐特性<sup>[39]</sup>。而 GA 能减少植株对  $\text{Na}^+$  的吸收, 可有效缓解盐碱胁迫对植物生长的抑制作用<sup>[40]</sup>。在油菜(*Brassica napus*)中, 干旱胁迫下叶片的 ABA 和 SA 含量在胁迫前期同时增加, 到后期时, 淀粉降解相关基因 *BAM1* 上调表达, 并与 ABA 的表达呈正相关, 而与 SA 及 SA 调控相关基因的表达呈负相关<sup>[41]</sup>。大麦(*Hordeum vulgare*)在外源施加 GA 的处理下,  $\beta$ -淀粉酶活性比对照组增加了 45.3%<sup>[42]</sup>。说明 SA 和 GA 也可以调控  $\beta$ -淀粉酶的活性, 进而增强植物对逆

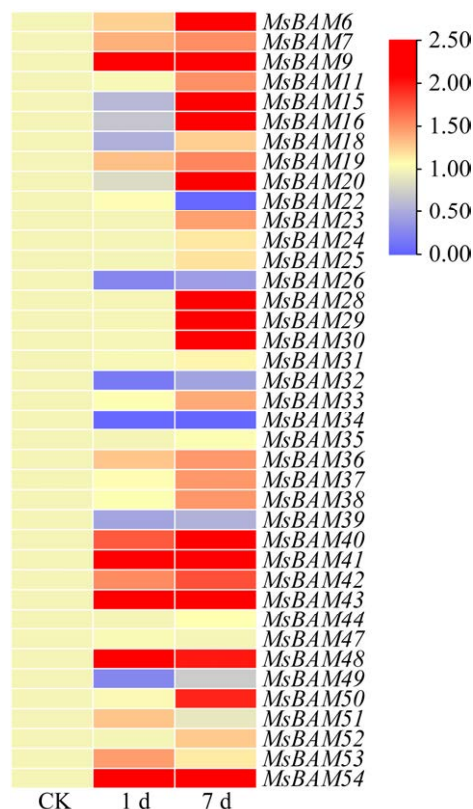


图 6 盐碱胁迫下紫花苜蓿 MsBAM 基因家族成员的转录组表达谱

Figure 6 Transcriptome expression profile of MsBAM gene family members under saline-alkali stress.

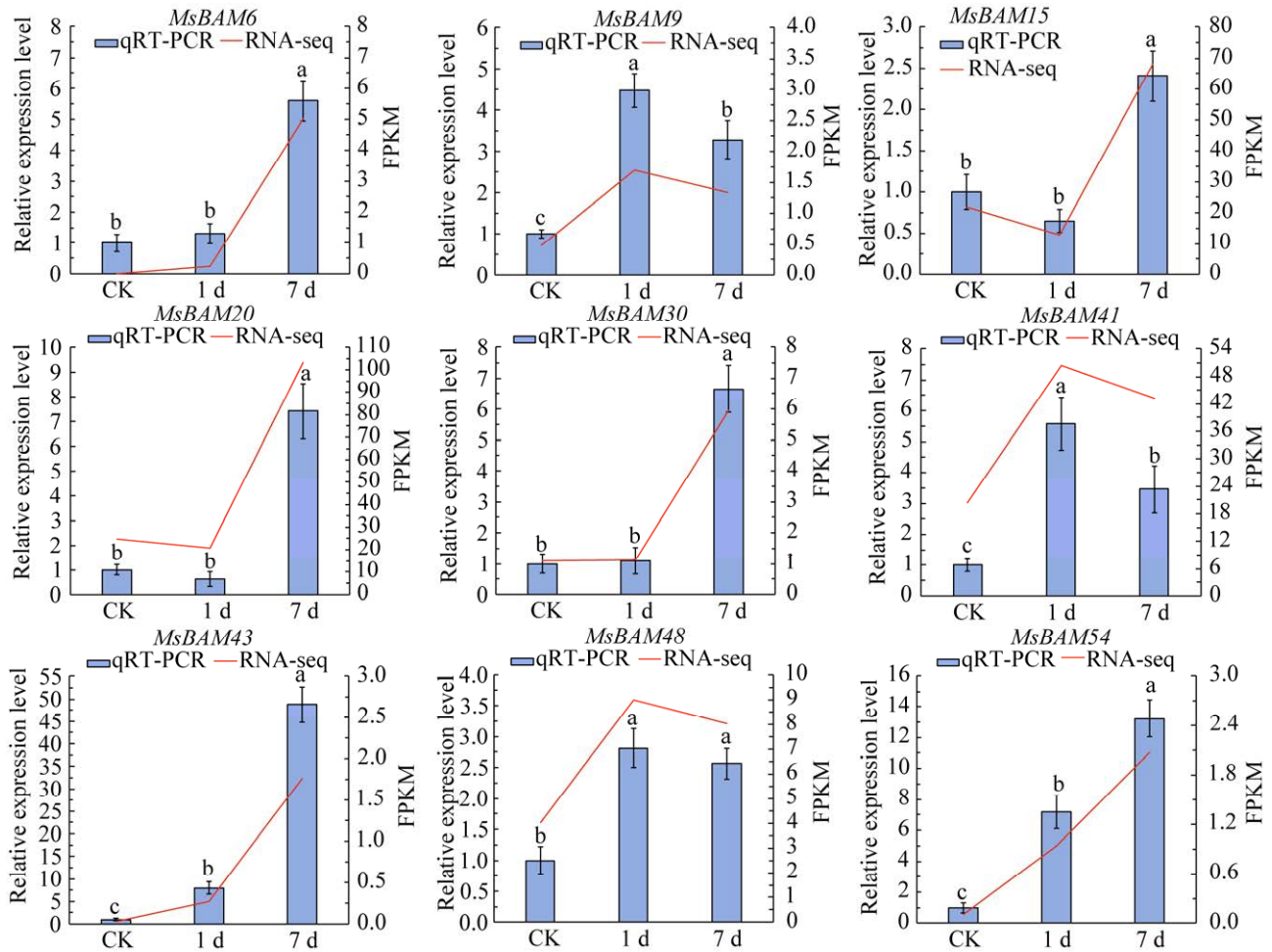


图7 盐碱胁迫下紫花苜蓿 MsBAM 基因家族成员的 qRT-PCR 结果 CK: 对照组; qRT-PCR: 实时荧光定量 PCR; RNA-seq: 转录组测序; FPKM: 转录组水平基因表达量。不同小写字母表示显著差异( $P < 0.05$ )。

Figure 7 qRT-PCR results of MsBAM gene family members under saline-alkali stress. CK: Control check; qRT-PCR: Real time quantitative PCR; RNA-seq: RNA sequencing; FPKM: Transcriptome-level gene expression. Different lowercase letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).

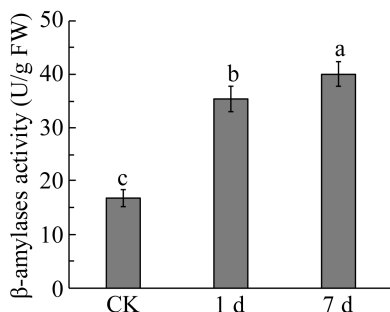


图8 盐碱胁迫下紫花苜蓿的  $\beta$ -淀粉酶酶活性 FW: 鲜重; 不同小写字母表示显著差异( $P < 0.05$ )。

Figure 8  $\beta$ -amylase activity of alfalfa under salt-alkali stress. FW: Fresh weight. Different lowercase letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).

境胁迫的抵抗能力。紫花苜蓿 MsBAM 基因的启动子中包含较多 ABA、SA 和 GA 响应元件, 提示  $\beta$ -淀粉酶基因的表达可能受到这些激素的调控。

分析了盐碱胁迫下紫花苜蓿 MsBAM 基因的转录组数据表达情况, 28 个 MsBAM 家族成员(占 51.85%)在盐碱胁迫 1 d 和 7 d 时明显上调表达。在香蕉(*Musa acuminata*) 16 个 MaBAM 基因家族成员中, 8 个 MaBAM 基因(占 50%)分别在冷、盐和渗透胁迫下上调, 其中 5 个 MaBAM 基因(占 31%)在所有胁迫下上调表达超过

10 倍<sup>[43]</sup>; 在石榴(*Punica granatum*)中有 3 个 PgBAM 基因(占 33%)在低温胁迫下上调表达, 其中 *PgBAM4* 的表达在低温胁迫下上调 6.65 倍<sup>[44]</sup>; 在茶树(*Camellia sinensis*)中, 3 个 CsBAM 基因(占 33%)在盐胁迫下上调表达, 6 个 CsBAM 基因(占 66%)在低温胁迫下上调表达, 其中 *CsBAM3* 上调表达超过 10 倍<sup>[45]</sup>, 可见 BAM 基因响应各种非生物胁迫。油菜(*Brassica napus*)  $\beta$ -淀粉酶在盐胁迫下活性提高, 水解淀粉能力增强, 使淀粉含量下降, 提高了油菜对盐碱胁迫的抵抗能力<sup>[46]</sup>。本研究对盐碱胁迫下  $\beta$ -淀粉酶的活性测定得到了相似结果, 在胁迫 1 d 和 7 d 时酶活性显著提高, 可能是盐碱胁迫下是 28 个 MsBAM 基因的上调表达提高了  $\beta$ -淀粉酶的活性。其中, *MsBAM9*、*MsBAM41*、*MsBAM43*、*MsBAM48* 和 *MsBAM54* 这 5 个基因家族成员在盐碱胁迫下均上调 2 倍以上, 这些基因对于提高  $\beta$ -淀粉酶的活性可能起到关键的作用。

本研究在紫花苜蓿全基因组鉴定出 54 个紫花苜蓿 BAM 基因, 分为 8 个亚族, 分布在 27 条染色体上, 所有 MsBAM 蛋白均具有典型的糖基水解结构域, MsBAM 基因的启动子具有响应非生物胁迫的顺式作用元件。大部分 MsBAM 基因响应盐碱胁迫, 并且在盐碱胁迫下  $\beta$ -淀粉酶活性显著提高。本研究为进一步研究紫花苜蓿 MsBAM 基因抵抗盐碱胁迫的功能奠定了理论基础。

## REFERENCES

[1] SHABALA S. Learning from halophytes: physiological basis and strategies to improve abiotic stress tolerance in crops[J]. *Annals of Botany*, 2013, 112(7): 1209-1221.

[2] WANG XX, WANG WC, HUANG JL, PENG SB, XIONG DL. Diffusional conductance to CO<sub>2</sub> is the key limitation to photosynthesis in salt-stressed leaves of rice (*Oryza sativa*)[J]. *Physiologia Plantarum*, 2018, 163(1): 45-58.

[3] HUANG LH, LIANG ZW, SUAREZ DL, WANG ZC, WANG MM, YANG HY, LIU M. Impact of cultivation

year, nitrogen fertilization rate and irrigation water quality on soil salinity and soil nitrogen in saline-sodic paddy fields in Northeast China[J]. *The Journal of Agricultural Science*, 2016, 154(4): 632-646.

[4] HAN XY, QU YP, LI D, QIU Y, YU Y, FENG YJ. Remediation of saline-sodic soil by plant microbial desalination cell[J]. *Chemosphere*, 2021, 277: 130275.

[5] ZHOU Q, LUO D, CHAI XT, WU YG, WANG YR, NAN ZB, YANG QC, LIU WX, LIU ZP. Multiple regulatory networks are activated during cold stress in *Medicago sativa* L.[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(10): 3169.

[6] BOURQUE CW. Central mechanisms of osmosensation and systemic osmoregulation[J]. *Nature Reviews Neuroscience*, 2008, 9(7): 519-531.

[7] ZEEMAN SC, KOSSMANN J, SMITH AM. Starch: its metabolism, evolution, and biotechnological modification in plants[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2010, 61: 209-234.

[8] SMITH AM, ZEEMAN SC, SMITH SM. Starch degradation[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2005, 56: 73-98.

[9] GUO R, YANG ZZ, LI F, YAN CR, ZHONG XL, LIU Q, XIA X, LI HR, ZHAO L. Comparative metabolic responses and adaptive strategies of wheat (*Triticum aestivum*) to salt and alkali stress[J]. *BMC Plant Biology*, 2015, 15: 170.

[10] ZHAO LY, GONG X, GAO JZ, DONG HZ, ZHANG SL, TAO ST, HUANG XS. Transcriptomic and evolutionary analyses of white pear (*Pyrus bretschneideri*)  $\beta$ -amylase genes reveals their importance for cold and drought stress responses[J]. *Gene*, 2019, 689: 102-113.

[11] VU VV, MARLETTA MA. Starch-degrading polysaccharide monooxygenases[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2016, 73(14): 2809-2819.

[12] GUPTA AK, KAUR N. Sugar signalling and gene expression in relation to carbohydrate metabolism under abiotic stresses in plants[J]. *Journal of Biosciences*, 2005, 30(5): 761-776.

[13] MONROE JD, STORM AR. Review: the *Arabidopsis*  $\beta$ -amylase (*BAM*) gene family: diversity of form and function[J]. *Plant Science*, 2018, 276: 163-170.

[14] KOIDE T, OHNISHI Y, HORINOUCI S. Characterization of recombinant  $\beta$ -amylases from *Oryza sativa*[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2011, 75(4): 793-796.

[15] FULTON DC, STETTLER M, METTLER T, VAUGHAN CK, LI J, FRANCISCO P, GIL M, REINHOLD H, EICKE S, MESSERLI G, DORKEN G, HALLIDAY K, SMITH AM, SMITH SM, ZEEMAN SC. Beta-AMYLASE4, a noncatalytic protein required for starch breakdown, acts upstream of three active beta-amylases in *Arabidopsis* chloroplasts[J]. *The Plant Cell*, 2008, 20(4): 1040-1058.

[16] MASON-GAMER RJ. The *beta*-amylase genes of grasses and a phylogenetic analysis of the *Triticeae* (Poaceae)[J]. *American Journal of Botany*, 2005, 92(6): 1045-1058.

[17] WANG LL, JING MM, GU SL, LI DL, DAI XH,



- CHEN ZH, CHEN JJ. Genome-wide investigation of *BAM* gene family in *Annona atemoya*: evolution and expression network profiles during fruit ripening[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(13): 10516.
- [18] YANG TY, LI HR, LI LW, WEI WL, HUANG YH, XIONG FQ, WEI MG. Genome-wide characterization and expression analysis of  $\alpha$ -amylase and  $\beta$ -amylase genes underlying drought tolerance in cassava[J]. BMC Genomics, 2023, 24(1): 190.
- [19] FRANCISCO P, LI J, SMITH SM. The gene encoding the catalytically inactive  $\beta$ -amylase *BAM4* involved in starch breakdown in *Arabidopsis* leaves is expressed preferentially in vascular tissues in source and sink organs[J]. Journal of Plant Physiology, 2010, 167(11): 890-895.
- [20] PRASCH CM, OTT KV, BAUER H, ACHE P, HEDRICH R, SONNEWALD U.  $\beta$ -amylase1 mutant *Arabidopsis* plants show improved drought tolerance due to reduced starch breakdown in guard cells[J]. Journal of Experimental Botany, 2015, 66(19): 6059-6067.
- [21] KAPLAN F, GUY CL. RNA interference of *Arabidopsis* beta-amylase8 prevents maltose accumulation upon cold shock and increases sensitivity of PSII photochemical efficiency to freezing stress[J]. Plant Journal, 2005, 44(5): 730-743.
- [22] ZHU H, YANG X, WANG X, LI QY, GUO JY, MA T, ZHAO CM, TANG YY, QIAO LX, WANG JS, SUI JM. The sweetpotato  $\beta$ -amylase gene *IbBAM1.1* enhances drought and salt stress resistance by regulating ROS homeostasis and osmotic balance[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2021, 168: 167-176.
- [23] ZHAO LY, YANG TY, XING CH, DONG HZ, QI KJ, GAO JZ, TAO ST, WU JY, WU J, ZHANG SL, HUANG XS. The  $\beta$ -amylase *PbrBAM3* from pear (*Pyrus betulaefolia*) regulates soluble sugar accumulation and ROS homeostasis in response to cold stress[J]. Plant Science, 2019, 287: 110184.
- [24] GUO KW, XU ZS, HUO YZ, SUN Q, WANG Y, CHE YH, WANG JC, LI W, ZHANG HH. Effects of salt concentration, pH, and their interaction on plant growth, nutrient uptake, and photochemistry of alfalfa (*Medicago sativa*) leaves[J]. Plant Signaling & Behavior, 2020, 15(12): 1832373.
- [25] ZHANG HH, LI X, NAN X, SUN GY, SUN ML, CAI DJ, GU SY. Alkalinity and salinity tolerance during seed germination and early seedling stages of three alfalfa (*Medicago sativa* L.) cultivars[J]. Legume Research-an International Journal, 2017, 40(5).
- [26] MIN YF, YU D, YANG JH, ZHAO WD, ZHANG LS, BAI Y, GUO CH. Bioinformatics and expression analysis of proline metabolism-related gene families in alfalfa under saline-alkali stress[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2023, 205: 108182.
- [27] AN YM, SONG LL, LIU YR, SHU YJ, GUO CH. *De novo* transcriptional analysis of alfalfa in response to saline-alkaline stress[J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 7: 931.
- [28] FRANDSEN TP, LOK F, MIRGORODSKAYA E, ROEPSTORFF P, SVENSSON B. Purification, enzymatic characterization, and nucleotide sequence of a high-isoelectric-point alpha-glucosidase from barley malt[J]. Plant Physiology, 2000, 123(1): 275-286.
- [29] TOTSUKA A, NONG VH, KADOKAWA H, KIM CS, ITOH Y, FUKAZAWA C. Residues essential for catalytic activity of soybean beta-amylase[J]. European Journal of Biochemistry, 1994, 221(2): 649-654.
- [30] ZHANG DL, WANG Y, JIA BC, TIAN XQ, CHU J, YIN HB, JAMESON PE, CHEN SH, GUO SL. Genome-wide identification and expression analysis of the  $\beta$ -amylase gene family in *Chenopodium quinoa*[J]. DNA and Cell Biology, 2021, 40(7): 936-948.
- [31] LI MM, CHEN XH, HUANG WQ, WU KY, BAI Y, GUO DL, GUO CH, SHU YJ. Comprehensive identification of the  $\beta$ -amylase (BAM) gene family in response to cold stress in white clover[J]. Plants, 2024, 13(2): 154.
- [32] PENG T, ZHU XF, DUAN N, LIU JH. PtrBAM1, a  $\beta$ -amylase-coding gene of *Poncirus trifoliata*, is a CBF regulon member with function in cold tolerance by modulating soluble sugar levels[J]. Plant, Cell & Environment, 2014, 37(12): 2754-2767.
- [33] YANG YL, SUN FL, WANG PL, YUSUYIN M, KUERBAN W, LAI CX, LI CP, MA J, XIAO F. Genome-wide identification and preliminary functional analysis of BAM ( $\beta$ -amylase) gene family in upland cotton[J]. Genes, 2023, 14(11): 2077.
- [34] MA YP, HAN YR, FENG XR, GAO HD, CAO B, SONG LH. Genome-wide identification of BAM ( $\beta$ -amylase) gene family in jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.) and expression in response to abiotic stress[J]. BMC Genomics, 2022, 23(1): 438.
- [35] BOWERS JE, CHAPMAN BA, RONG JK, PATERSON AH. Unravelling angiosperm genome evolution by phylogenetic analysis of chromosomal duplication events[J]. Nature, 2003, 422(6930): 433-438.
- [36] THALMANN M, PAZMINO D, SEUNG D, HORRER D, NIGRO A, MEIER T, KÖLLING K, PFEIFHOFER HW, ZEEMAN SC, SANTELIA D. Regulation of leaf starch degradation by abscisic acid is important for osmotic stress tolerance in plants[J]. The Plant Cell, 2016, 28(8): 1860-1878.
- [37] LIU Y, ZHANG Y, ZHENG Y, NIE XH, WANG YF, YU WJ, SU SC, CAO QQ, QIN L, XING Y. Beta-amylase and phosphatidic acid involved in recalcitrant seed germination of Chinese chestnut[J]. Frontiers in Plant Science, 2022, 13: 828270.
- [38] ZHANG Y, ZHU J, KHAN M, WANG Y, XIAO W, FANG T, QU J, XIAO P, LI CL, LIU JH. Transcription factors *ABF4* and *ABR1* synergistically regulate amylase-mediated starch catabolism in drought tolerance[J]. Plant Physiology, 2023, 191(1): 591-609.
- [39] RAJABI DEHNAVI A, ZAHEDI M, LUDWICZAK A, PIERNIK A. Foliar application of salicylic acid improves salt tolerance of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench)[J]. Plants, 2022, 11(3): 368.
- [40] LI Z, CHEN H, GUAN QJ, LI LX, XUAN YH. Gibberellic acid signaling promotes resistance to

- saline-alkaline stress by increasing the uptake of ammonium in rice[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2024, 207: 108424.
- [41] PARK SH, LEE BR, LA VH, MAMUN MA, BAE DW, KIM TH. Drought intensity-responsive salicylic acid and abscisic acid crosstalk with the sugar signaling and metabolic pathway in *Brassica napus*[J]. *Plants*, 2021, 10(3): 610.
- [42] YADAV SK, LUTHRA YP, SOOD DR, AGGARWAL NK. Gibberellic acid (GA3) induced changes in proanthocyanidins and malt quality of two- and six-row husked barleys[J]. *Plant Foods for Human Nutrition*, 2000, 55(2): 87-96.
- [43] MIAO HX, SUN PG, MIAO YL, LIU JH, ZHANG JB, JIA CH, WANG JY, WANG Z, JIN ZQ, XU BY. Genome-wide identification and expression analysis of the  $\beta$ -amylase genes strongly associated with fruit development, ripening, and abiotic stress response in two banana cultivars[J]. *Frontiers of Agricultural Science and Engineering*, 2016, 3(4): 346.
- [44] LIU LB, XU SW, ZHANG LH, ZHENG J. A genome-wide analysis of the *BAM* gene family and identification of the cold-responsive genes in pomegranate (*Punica granatum* L.)[J]. *Plants*, 2024, 13(10): 1321.
- [45] YUE C, CAO HL, LIN HZ, HU J, YE YJ, LI JM, HAO ZL, HAO XY, SUN Y, YANG YJ, WANG XC. Expression patterns of alpha-amylase and beta-amylase genes provide insights into the molecular mechanisms underlying the responses of tea plants (*Camellia sinensis*) to stress and postharvest processing treatments[J]. *Planta*, 2019, 250(1): 281-298.
- [46] LUO D, JIA ZQ, CHENG Y, ZOU XL, LV Y. Genome-wide analysis of the  $\beta$ -amylase gene family in *Brassica* L. crops and expression profiles of *BnaBAM* genes in response to abiotic stresses[J]. *Agronomy*, 2020, 10(12): 1855.