

DOI:10.11686/cyxb2025280

<http://cyxb.magtech.com.cn>

刘昊臻, 晁嘉璐, 赵士钦, 等. 紫花苜蓿 *BBR-BPC* 全基因组鉴定及响应种子老化的表达模式分析. 草业学报, 2026, 35(7): 135—150.

LIU Hao-zhen, CHAO Jia-lu, ZHAO Shi-qin, *et al.* Genome-wide identification of *BBR-BPC* genes in *Medicago sativa* and their transcript profiles in response to seed aging. Acta Prataculturae Sinica, 2026, 35(7): 135—150.

紫花苜蓿 *BBR-BPC* 全基因组鉴定 及响应种子老化的表达模式分析

刘昊臻, 晁嘉璐, 赵士钦, 王成, 张景铤, 孙守江*

(宁夏大学林业与草业学院, 宁夏 银川 750021)

摘要: 种子生产是支撑农业产业发展的核心环节, 优质种子是培育高产、高抗逆性作物的基础。即使在最佳储存条件下, 种子老化仍不可避免。活性氧(reactive oxygen species, ROS)造成的氧化应激被认为是导致种子活力下降的关键因素, 种子活力取决于ROS产生和抗氧化能力之间的平衡。为了保持种子最佳活力, ROS水平的调节至关重要。*Barley B Recombinant-Basic Pentacysteine* (*BBR* 净产出能量 *BPC*, *BBR-BPC*) 转录因子家族是一组相对保守的转录因子, 在植物形态发生、器官发育和对非生物胁迫的反应中起关键作用。研究发现, *BBR-BPC* 家族成员参与植物中活性氧平衡的调节, 推测其可能参与种子活力的调控。然而, 目前对该基因家族中哪些成员参与紫花苜蓿种子活力的调控尚不明确。基于此, 本研究从‘新疆大叶’紫花苜蓿(Xinjiang Daye)全基因组水平鉴定 *BBR-BPC* 家族成员, 利用转录组和 RT-qPCR 分析其在不同活力种子吸胀萌发过程中的表达模式, 挖掘潜在参与种子老化调控的 *BBR-BPC* 家族成员, 并预测与该成员潜在互作的相关蛋白。在紫花苜蓿中共鉴定到 16 个 *MsBBR-BPC* 基因家族成员; 系统发育分析表明, *MsBBR-BPC* 基因家族共分为 8 个基因亚族, 不均匀地定位在 13 条染色体上; 共线性分析表明, 片段重复是该基因家族在进化过程中扩张的关键驱动力。基因表达模式分析发现, *MsBBR-BPC10*、*MsBBR-BPC13* 和 *MsBBR-BPC16* 基因在种子老化 24 d 后显示高表达水平, 在老化 8 d, 吸胀至 12 和 24 h 时也显示出高表达水平, 推测其可能参与种子活力的调控。STRING 数据库蛋白预测网络分析表明, *MsBBR-BPC16* 与 *MsBBR-BPC11* 存在较强的互作关系。此外, *MsBBR-BPC16* 与 *AGL11*、*PAT21*、*ZHD3* 和 *GPL3* 蛋白也存在一定的潜在互作关系。本研究挖掘到 3 个(*MsBBR-BPC10*、*MsBBR-BPC13* 和 *MsBBR-BPC16*) 响应种子老化胁迫、潜在参与种子活力调控的 *MsBBR-BPC* 基因, 还需进一步的研究来阐明其调控种子活力的确切途径, 蛋白之间的互作关系也同样需要进一步验证。本研究为 *BBR-BPC* 基因调控紫花苜蓿种子老化、揭示 ROS 平衡与种子活力维持的分子调控系统提供了参考, 也为后续蛋白功能验证提供了研究基础, 并可用于紫花苜蓿种子活力的遗传改良。

关键词: 紫花苜蓿; *BBR-BPC*; 基因家族分析; 表达模式; 种子老化

Genome-wide identification of *BBR-BPC* genes in *Medicago sativa* and their transcript profiles in response to seed aging

LIU Hao-zhen, CHAO Jia-lu, ZHAO Shi-qin, WANG Cheng, ZHANG Jing-hong, SUN Shou-jiang*

College of Forestry and Grassland Science, Ningxia University, Yinchuan 750021, China

Abstract: The production of seeds is a vital part of agricultural development. High-quality seeds are the key to growing crops that are both high yielding and able to tolerate stress. Even under optimal storage conditions, the

收稿日期: 2025-07-08; 改回日期: 2025-09-09

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(C类)(32503269)资助。

作者简介: 刘昊臻(2002—), 男, 甘肃庆阳人, 在读硕士。E-mail: lhf3641mnb@163.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: shoujiangsun@nxu.edu.cn

process of seed aging remains an unavoidable occurrence. Seed viability is affected by the balance between the production of reactive oxygen species (ROS) and antioxidant capacity, and this balance is affected by oxidative stress. It is therefore crucial to regulate ROS levels if optimal seed vigor is to be maintained. The Barley B Recombinant-Basic Pentacysteine (BBR-BPC) transcription factor family is a conserved group of transcription factors playing crucial roles in plant morphogenesis, organ development, and responses to abiotic stresses. Members of the BBR-BPC family are known to be involved in regulating the ROS balance in plants, suggesting that they may play a role in controlling seed viability. Nevertheless, it is uncertain which genes in this family are responsible for controlling the vitality of alfalfa (*Medicago sativa*) seeds. In this study, we focused on the *BBR-BPC* gene family in the alfalfa cultivar ‘Xinjiang Daye’. Their transcript profiles during the processes of swelling and germination of seeds with varying viability were determined by transcriptome and RT-qPCR analyses. These analyses highlighted the *BBR-BPC* family members potentially involved in the regulation of seed aging. In addition, proteins that potentially interact with members of the *BBR-BPC* family were predicted. Sixteen *MsBBR-BPC* genes were identified in the alfalfa genome and a phylogenetic analysis grouped them into eight subfamilies. The 16 *MsBBR-BPC* genes were distributed unevenly across 13 chromosomes. A collinearity analysis indicated that expansion within this gene family during evolution has been driven by segmental duplication. Analyses of gene transcript profiles revealed high transcript levels of *MsBBR-BPC10*, *MsBBR-BPC13*, and *MsBBR-BPC16* at 24 days of seed aging, 8 days of seed aging, and 12–24 hours after imbibition, suggesting that these family members participate in the control of seed viability. A protein-protein interaction network analysis *via* the STRING database revealed a strong interaction between *MsBBR-BPC16* and *MsBBR-BPC11*. In addition, *MsBBR-BPC16* was predicted to interact with *AGL11*, *PAT21*, *ZHD3*, and *GPL3* proteins. This study pinpointed three *MsBBR-BPCs* (*MsBBR-BPC10*, *MsBBR-BPC13*, and *MsBBR-BPC16*) that are involved in seed aging stress and may play a role in controlling seed viability. More research is required to clarify their roles in the control of seed viability, and to verify the protein interactions predicted here. The results of this research provide new insights into the molecular regulatory system governing alfalfa seed aging *via* *BBR-BPC* transcription factors, and provide further evidence that the ROS balance plays a role in maintaining seed viability. These findings have established a research foundation for the functional validation of candidate proteins, and for the use of their encoding genes in the genetic improvement of alfalfa seed viability.

Key words: alfalfa; *BBR-BPC*; gene family analysis; expression pattern; seed aging

种子质量在农业发展、保存遗传资源和保证遗传多样性中起到不可或缺的作用^[1],然而在最佳条件下保存的种子仍然会随着时间的流逝而失去活力,这一过程便称为种子老化^[2]。种子老化的过程是累积的、不可逆的,其对作物生产有着重大影响^[3]。此外,种子老化与多种因素有关,包括遗传因素、非生物胁迫、自身细胞复杂的过程等^[4–5]。近年的研究发现,外界胁迫和种子老化会使植物细胞产生并积累活性氧(reactive oxygen species, ROS),从而导致细胞抗氧化系统受到损伤,种子活力由此下降^[6]。因此,深入研究 ROS 在影响种子老化过程中的功能与机制有着重要的意义。*Barley B Recombinant-Basic Pentacysteine (BBR-BPC)*是一个较为保守的基因家族,在植物生长发育和逆境响应中起着重要作用,参与植物中活性氧平衡的调节^[7]。这为研究种子老化机制带来了新的角度。

GBP 蛋白(interferon-inducible guanylate-binding proteins)是一类可以与 GAGA 重复序列(GAGA element)结合的蛋白质。同时 BBR (Barley B Recombinant)蛋白也具有结合 GAGA 序列的特性,它与 GBP 蛋白具有相似的保守结构域和功能,因此有学者将它们归类为一种转录因子^[8]。因为其 C 端存在多个保守的半胱氨酸残基,所以这些蛋白也被称为 BPC 蛋白^[9]。随着研究的深入,它们通常被称为 BBR-BPC 蛋白。*BBR-BPC*是植物中一类独

特的转录因子,在器官胚珠发育、细胞分裂和衰老以及植物激素反应中起着关键作用^[10-11]。鉴于它们在植物功能方面的多样性,这些转录因子已在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)^[12]、黄瓜(*Cucumis sativus*)^[13]、水稻(*Oryza sativa*)^[14]和山茶花(*Camellia japonica*)^[15]等物种中得到了广泛的研究。

目前,许多植物中都鉴定出 *BBR-BPC* 基因。先前的研究中,拟南芥有 7 个 *BBR-BPC* 基因。它们对植物发育有着重要作用,拟南芥中 *BBR-BPC* 基因的丧失会造成植物矮小,胚珠发育和根系生长异常^[12],通过下调 *STM* 和 *BP* 基因后拟南芥花的发育也会受到影响。此外,在干旱、盐碱胁迫下敲除拟南芥 *AtBBR-BPC2* 基因后,拟南芥显现出更高的抗胁迫能力,而过表达则会表现出敏感性^[16]。在黄瓜中 *BBR-BPC* 基因调控种子萌发的过程,同时也在非生物和激素胁迫下基因表达量显著增加^[13]。在最近的研究中,有学者发现 *BBR-BPC* 基因家族对植物昼夜节律调控以及盐胁迫反应有着积极的响应^[17-18]。这些对揭示 *BBR-BPC* 基因家族在植物生长周期和逆境胁迫中调节 ROS 的机制有着重要作用。

紫花苜蓿(*Medicago sativa*)因蛋白质丰富、营养价值高,作为世界范围内广为种植的饲草,被称为“牧草之王”^[19]。随着生态环境的恶化,紫花苜蓿种子的发育环境遭受严重威胁,诸多因素会造成种子老化,影响植物生长发育每个阶段的整体质量,从而使紫花苜蓿减产、品质下降。*BBR-BPC* 基因家族已经在胁迫反应,以及参与 ROS 调节的作用中有诸多报道^[13],推测其可能参与到种子活力的调控,种子老化降低了正常种子活力。然而 *BBR-BPC* 基因家族中哪些成员在响应种子老化,参与种子活力的调控机制却无法得到阐明。因此本研究通过生物信息学方法鉴定紫花苜蓿中 *BBR-BPC* 家族基因,并分析不同成员的特征、保守性和响应种子老化的表达模式等,挖掘参与紫花苜蓿种子活力调控和响应种子老化的 *BBR-BPC* 基因家族成员,并预测与其成员互作的蛋白。本研究为进一步了解种子老化本质和 *BBR-BPC* 基因的分子调控系统提供参考,为深入研究种子老化的分子调控机制提供更广阔的视角,并期望在此基础上为阐明 *BBR-BPC* 基因调控种子活力的综合网络提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

‘新疆大叶’紫花苜蓿(*M. sativa* ‘Xinjiang Daye’)为研究材料。

1.2 紫花苜蓿 *BBR-BPC* 基因家族成员的鉴定及其编码蛋白理化性质的分析

紫花苜蓿是最重要且最为广泛利用的牧草之一。为了确定紫花苜蓿中 *BBR-BPC* 基因家族,在 MODMS 在线网站(<https://modms.lzu.edu.cn/>)下载‘新疆大叶’紫花苜蓿的全基因组序列、基因注释以及蛋白序列等。同时,从 TAIR 数据库(<https://www.arabidopsis.org/>)下载了来自拟南芥的序列信息,以拟南芥 *AtBBR-BPC* 蛋白序列作为紫花苜蓿同源性比较的参考。随后在 InterPro 数据库(<https://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/pfam/>)下载 *BBR-BPC* 基因家族的隐马尔可夫模型(Hidden Markov Model, PF06217),通过 TBtools^[20](2.130 版本)软件进行 BLAST 比对和 HMMER 搜索,保留两种方法所获得的蛋白序列并去除多余序列,筛选出来自紫花苜蓿的 *BBR-BPC* 蛋白序列。所得结果分别在 NCBI 在线工具 BatchCD-Search(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>)和 SMART 数据库(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)识别 *BBR-BPC* 蛋白中的保守结构域,以确保候选序列的准确性。最后保留具有 *BBR-BPC* 蛋白特征的基因进行进一步分析。

为分析 *BBR-BPC* 基因家族的编码蛋白理化性质和亚细胞定位,使用 ExPASy 网站(<https://www.expasy.org/>)对紫花苜蓿 *BBR-BPC* 蛋白序列进行等电点、不稳定系数分析以及分子质量和氨基酸数目的计算,并且利用 WoLF PSORT 工具(<https://wolfsort.hgc.jp/>)对蛋白家族的亚细胞进行预测。

1.3 染色体定位

基于紫花苜蓿基因组的注释文件,利用 TBtools 软件提取染色体长度以及 *BBR-BPC* 基因家族成员位置信息,随后进行可视化处理,同时使用 Adobe Illustrator 软件对所得图片进行美化。

1.4 共线性分析

为分析 *BBR-BPC* 基因家族在亲缘物种、双子叶物种以及单子叶物种间的关系,在 TBtools 软件中将紫花苜蓿蛋白序列与蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*)、大豆(*Glycine max*)、拟南芥和水稻进行共线性分析,并将结果分

别进行可视化处理。

1.5 系统发育分析

为分析 *BBR-BPC* 基因家族的系统发育关系,使用软件 MEGA 12^[21]对紫花苜蓿 *BBR-BPC* 基因家族蛋白序列与拟南芥蛋白序列进行多序列比对,随后使用最大似然值法(maximum likelihood, ML)构建系统进化树。使用 ITOL 在线网站(<https://itol.embl.de/>)生成系统发育树并进行美化。

1.6 蛋白质保守基序和基因结构分析

为进一步探索 *BBR-BPC* 基因家族的保守性和基因结构,使用 MEME 在线网站(<https://meme-suite.org/meme/>)预测蛋白的保守基序,其数量设置为 6,其他参数为默认值。之后利用所获得的蛋白保守基序及结构域信息在 TBtools 软件进行可视化处理。

1.7 顺式作用元件分析

为探究 *BBR-BPC* 基因家族的关键功能元件,使用 TBtools 软件提取紫花苜蓿中 *BBR-BPC* 基因家族成员启动子区域上游 2000 bp 范围内的序列信息,后利用 PlantCARE 数据库分析提取的启动子序列,使用 TBtools 软件对结果进行可视化处理。

1.8 *BBR-BPC* 基因在紫花苜蓿不同组织中的表达模式

试验于 2025 年 2—5 月在宁夏大学林业与草业学院牧草种子实验室进行。紫花苜蓿在温室中培养至盛花期时,收集单株根、茎、叶、花组织,将紫花苜蓿不同组织与种子于液氮速冻后放入 -80°C 冰箱用于 RNA 提取。使用快速 RNA 提取试剂盒(华越洋生物技术有限公司,中国)提取总 RNA。随后,使用 SuperMix for qPCR 试剂盒(TransGen Biotech, 中国)进行反转录。采用 CFX96 实时荧光定量系统(Bio-Rad, Hercules, 加利福尼亚州, 美国)进行 qRT-PCR 分析。以 *MsACTIN* 基因作为内参基因。qRT-PCR 循环程序包括: 95°C , 3 min, 然后进行 40 个循环,每个循环包括: 95°C , 15 s; 60°C , 30 s。使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法^[22]分析基因的转录水平。qRT-PCR 分析所用全部基因引物信息见表 1。

1.9 *BBR-BPC* 基因家族成员响应种子老化的表达模式分析

为挖掘潜在参与种子老化调控的 *BBR-BPC* 家族成员,使用课题组前期已发表的不同活力(D_0 、 D_8 、 D_{16} 、 D_{24})紫花苜蓿种子转录组以及老化种子(D_0 、 D_8)吸胀萌发阶段(6、12、24、36 h)转录组数据(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>, SRA, BioProject PRJNA1012365),系统分析 *BBR-BPC* 基因家族成员响应种子老化胁迫的表达模式。

1.10 数据统计与分析

使用 Excel 2024 进行基因表达分析数据的计算,利用 SPSS 30 软件对数据进行方差分析,采用 GraphPad Prism 10 和 R 语言中 Heatmap 工具包绘图。

2 结果与分析

2.1 紫花苜蓿 *BBR-BPC* 基因家族成员鉴定及其编码蛋白的理化性质分析

通过 Blast 和 HMM 对“新疆大叶”紫花苜蓿基因家族成员筛选和鉴定,共从中鉴定出 16 个基因,以拟南芥 *AtBBR-BPC* 的对应关系,将所得基因分别命名为 *MsBBR-BPC1*~*MsBBR-BPC16*。

对紫花苜蓿 *MsBBR-BPC* 基因编码蛋白的理化性质分析,结果表明, *MsBBR-BPC* 理论等电点为 6.61 (*MsBBR-BPC1*)~9.68 (*MsBBR-BPC9*、*MsBBR-BPC10*), *MsBBR-BPC1* 和 *MsBBR-BPC11* 小于 7 外,其余基因的等电点均高于 9,说明 *MsBBR-BPC1* 和 *MsBBR-BPC11* 为酸性蛋白,其余基因均作用于碱性细胞中(表 2)。 *MsBBR-BPC* 蛋白相对较小,分子质量为 19788.53 (*MsBBR-BPC1*)~37781.66 Da (*MsBBR-BPC3*),氨基酸数目为 176 (*MsBBR-BPC1*)~339 (*MsBBR-BPC3*、*MsBBR-BPC6*、*MsBBR-BPC8*)。 *MsBBR-BPC* 蛋白的不稳定系数均高于 40,说明 *MsBBR-BPC* 蛋白可能较不稳定。亚细胞定位显示, *MsBBR-BPC* 蛋白均位于细胞核中。通过染色体定位发现,16 个基因分布在 13 个染色体上, *MsBBR-BPC11*、*MsBBR-BPC13*、*MsBBR-BPC14* 分布在染色体 4.2 上, *MsBBR-BPC4*、*MsBBR-BPC12* 分布在染色体 4.1 上,其余染色体各分布一个基因。

表 1 qRT-PCR 分析引物信息

Table 1 Primers for qRT-PCR analysis

编号 No.	基因名称 Gene name	引物序列 Primer sequence (5′-3′)	产物大小 Product size (bp)	解链温度值 Melting temperature value (°C)
1	<i>MsBBR-BPC1</i>	F: GATGATGATGTGCTGAATATGC R: AACACTGCTATCATCCTTCG	480	51.9 51.0
2	<i>MsBBR-BPC2</i>	F: TGGATGATGATGTGCTGAAT R: CTTGTTGGTGCCATGTCTA	824	50.4 50.5
3	<i>MsBBR-BPC3</i>	F: GGAAGGCACAAAGCAGAT R: CCAATGGTCTTTAAGGTCAAC	963	50.3 50.7
4	<i>MsBBR-BPC4</i>	F: TGGATGATGATGTGCTGAAT R: CTTGTTGGTGCCATGTCTA	824	50.4 50.5
5	<i>MsBBR-BPC5</i>	F: TGGATGATGATGTGCTGAAT R: CTTGTTGGTGCCATGTCTA	824	50.4 50.5
6	<i>MsBBR-BPC6</i>	F: GGAAGGCACAAAGCAGAT R: CCAATGGTCTTTAAGGTCAAC	963	50.3 50.7
7	<i>MsBBR-BPC7</i>	F: TGGATGATGATGTGCTGAAT R: CTTGTTGGTGCCATGTCTA	824	50.4 50.5
8	<i>MsBBR-BPC8</i>	F: GGAAGGCACAAAGCAGAT R: CCAATGGTCTTTAAGGTCAAC	963	50.3 50.7
9	<i>MsBBR-BPC9</i>	F: GGATGGAGATAATGGACTTAAC R: AACTTGTTGGTGCCATGT	852	49.9 49.9
10	<i>MsBBR-BPC10</i>	F: GGATGGAGATAATGGACTTAAC R: AACTTGTTGGTGCCATGT	852	49.9 49.9
11	<i>MsBBR-BPC11</i>	F: AACGGTAGGCATAAGATGG R: TTGGTAGGTGTCTGTGATG	557	49.7 49.5
12	<i>MsBBR-BPC12</i>	F: ACGATGACCGCCAATATG R: AACGATTTGTTCCATGTCTG	918	50.0 50.1
13	<i>MsBBR-BPC13</i>	F: ACGATGACCGCCAATATG R: AACGATTTGTTCCATGTCTG	918	50.0 50.1
14	<i>MsBBR-BPC14</i>	F: TGGATGATGATGTGCTGAAT R: CTTGTTGGTGCCATGTCTA	824	50.4 50.5
15	<i>MsBBR-BPC15</i>	F: CATCAAGTAATTCCTTCTCTCG R: TTGTTGGTGCCATGTCTAG	859	50.6 50.5
16	<i>MsBBR-BPC16</i>	F: GGATGGAGATAATGGACTTAAC R: AACTTGTTGGTGCCATGT	852	49.9 49.9
17	<i>MsACTIN</i>	F: CAAAAGATGGCAGATGCTGAGGAT R: CATGACACCAGTATGACGAGGTCG	88	59.4 59.5

2.2 染色体定位

根据紫花苜蓿基因注释信息,对鉴定出的 16 个 *MsBBR-BPC* 基因进行染色体定位分析,发现 16 个基因分布在 13 个染色体上, *MsBBR-BPC11*、*MsBBR-BPC13*、*MsBBR-BPC14* 分布在染色体 4.2 上, *MsBBR-BPC11*、*MsBBR-BPC13* 基因在染色体上呈现小范围簇状分布, *MsBBR-BPC4*、*MsBBR-BPC12* 分布在染色体 4.1 上,其余染色体各分布一个基因(图 1)。其中 *MsBBR-BPC9*、*MsBBR-BPC10*、*MsBBR-BPC16* 位于染色体尾部基因密度较低的区域,而 *MsBBR-BPC1* 位于染色体尾部基因密度较高的区域;其他 12 个 *MsBBR-BPC* 基因均位于染色体

表2 *MsBBR-BPC* 基因编码蛋白理化性质分析

Table 2 Physicochemical characterization of protein encoded by the *MsBBR-BPC* gene

基因 Gene	基因 ID 号 Gene ID	等电点 Isoelectric point	分子质量 Molecular weight (Da)	氨基酸数目 Amino acids numbers	亚细胞定位 Subcellular localization	不稳定系数 Instability index	染色体定位 Chromosomal localization
<i>MsBBR-BPC1</i>	MS. gene36731	6.61	19788.53	176	细胞核 Nucleus	44.19	染色体 8.2 Chr8.2
<i>MsBBR-BPC2</i>	MS. gene023254	9.66	30878.44	280	细胞核 Nucleus	42.74	染色体 4.3 Chr4.3
<i>MsBBR-BPC3</i>	MS. gene63981	9.26	37781.66	339	细胞核 Nucleus	55.67	染色体 1.4 Chr1.4
<i>MsBBR-BPC4</i>	MS. gene08364	9.66	30861.46	280	细胞核 Nucleus	45.33	染色体 4.1 Chr4.1
<i>MsBBR-BPC5</i>	MS. gene34978	9.66	30888.48	280	细胞核 Nucleus	43.36	染色体 4.4 Chr4.4
<i>MsBBR-BPC6</i>	MS. gene24195	9.26	37779.68	339	细胞核 Nucleus	55.36	染色体 1.1 Chr1.1
<i>MsBBR-BPC7</i>	MS. gene31269	9.62	30866.43	280	细胞核 Nucleus	44.85	染色体 2.4 Chr2.4
<i>MsBBR-BPC8</i>	MS. gene64186	9.26	37765.66	339	细胞核 Nucleus	55.11	染色体 1.3 Chr1.3
<i>MsBBR-BPC9</i>	MS. gene041646	9.68	32142.97	289	细胞核 Nucleus	53.71	染色体 6.3 Chr6.3
<i>MsBBR-BPC10</i>	MS. gene27413	9.68	32124.93	289	细胞核 Nucleus	53.97	染色体 6.2 Chr6.2
<i>MsBBR-BPC11</i>	MS. gene030483	6.71	22261.95	195	细胞核 Nucleus	43.49	染色体 4.2 Chr4.2
<i>MsBBR-BPC12</i>	MS. gene79458	9.36	35360.99	312	细胞核 Nucleus	52.11	染色体 4.1 Chr4.1
<i>MsBBR-BPC13</i>	MS. gene030481	9.36	35373.04	312	细胞核 Nucleus	51.83	染色体 4.2 Chr4.2
<i>MsBBR-BPC14</i>	MS. gene028203	9.58	30908.43	280	细胞核 Nucleus	46.14	染色体 4.2 Chr4.2
<i>MsBBR-BPC15</i>	MS. gene028699	9.60	32650.41	295	细胞核 Nucleus	45.92	染色体 2.1 Chr2.1
<i>MsBBR-BPC16</i>	MS. gene000299	9.63	31986.78	288	细胞核 Nucleus	53.86	染色体 6.4 Chr6.4

头部基因密度较高的区域。值得注意的是,紫花苜蓿作为典型的同源四倍体,部分基因成员并未在所有4个预期的同源染色体上被发现,这可能是因为亚基因组在分化过程中造成的基因丢失,或者在物种进化过程中染色体发生断裂、融合、倒位等事件,造成基因易位到其他染色体。

2.3 基因共线性分析

生物遗传复杂性及适应能力依赖基因家族的扩展,而基因复制是基因家族扩展的动力,其深远地影响了基因组的进化,丰富了基因的多样性。因此对*BBR-BPC*基因家族进行种间和种内共线性分析,发现*MsBBR-BPC*基因组广泛存在着片段重复,在Chr1、Chr2、Chr4、Chr6为染色体内部基因复制事件,其余染色体并不包含片段重复及串联重复(图2)。这表明基因片段重复很可能在*MsBBR-BPC*基因家族中发挥着重要作用。

为进一步了解*BBR-BPC*基因家族在多个物种间的进化关系,构建了紫花苜蓿与蒺藜苜蓿、拟南芥、大豆和水稻的物种间共线性分析。结果表明,紫花苜蓿与蒺藜苜蓿有12对共线基因对,紫花苜蓿中的共线基因分布在10条染色体上,而在蒺藜苜蓿中,共线基因分布在3条染色体上;与大豆有20对共线基因对,在紫花苜蓿中的共线基因分布在9条染色体上,在大豆中,共线基因分布在5条染色体上;与拟南芥有10对共线基因对,共线基因分布于紫花苜蓿6条染色体,而在拟南芥中只有3条;与水稻基因共线对只有4对(图3)。这表明紫花苜蓿与蒺藜苜蓿、大豆、拟南芥在进化过程中有着高度的基因交换和相似性。

2.4 系统发育分析

为了解*BBR-BPC*基因家族的进化关系及系统发育,选取拟南芥与紫花苜蓿的蛋白序列构建ML系统进化树。将7个拟南芥AtBPC蛋白与16个MsBBR-BPC蛋白分为8个亚族,其中亚族Ⅰ、亚族Ⅱ、亚族Ⅴ所包含的MsBBR-BPC成员较多,此外,亚族Ⅱ、亚族Ⅴ包括具有代表性的拟南芥蛋白:亚族Ⅱ包括AtBPC1、AtBPC3;亚族Ⅴ包括AtBPC4和AtBPC5。在系统发育关系中,亚族Ⅰ中包含7个蛋白,分别为MsBBR-BPC1、MsBBR-

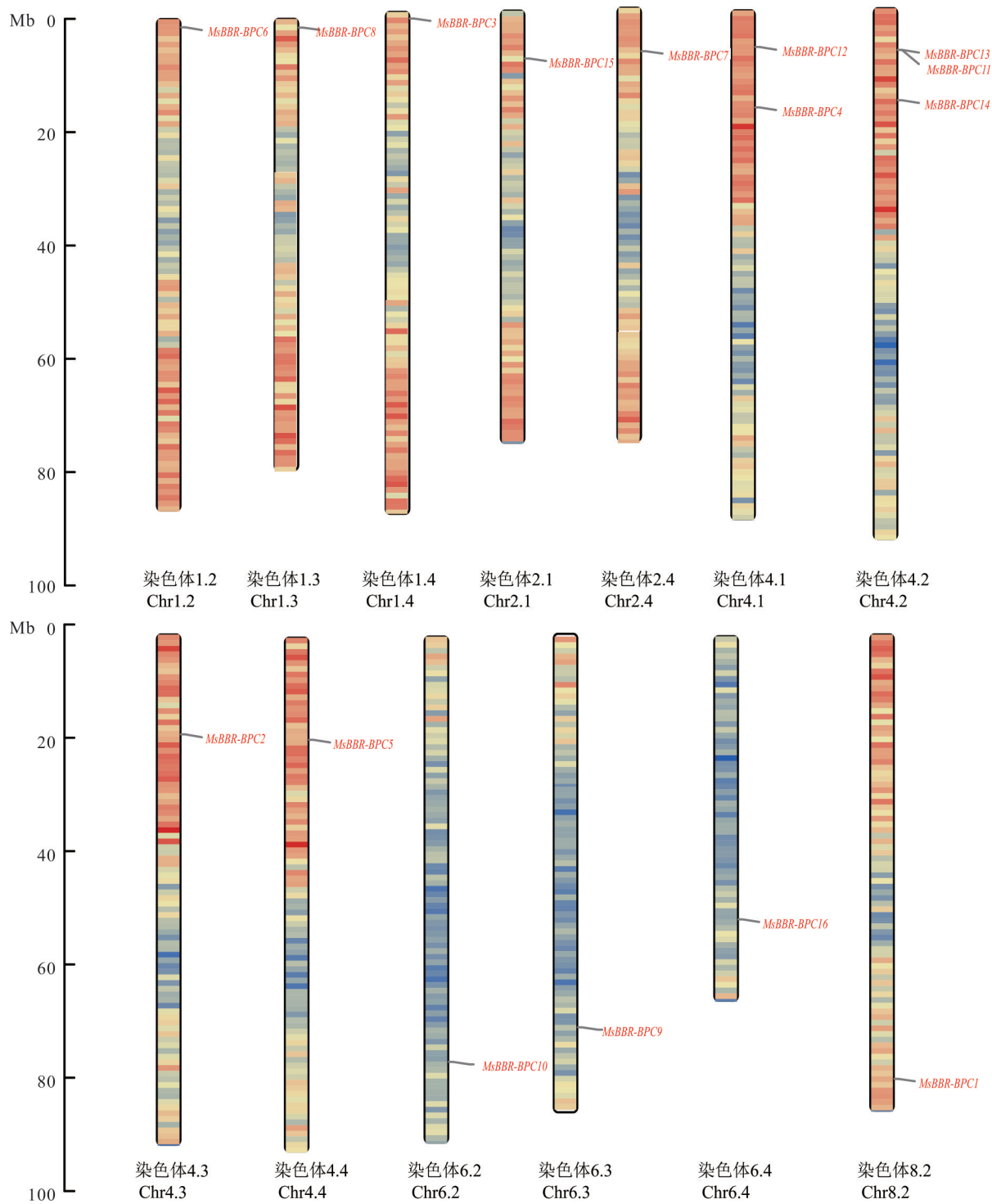


图 1 *MsBBR-BPC* 基因家族成员的染色体定位

Fig. 1 Chromosomal location of *MsBBR-BPC* gene family members

左侧的刻度表示染色体长度,染色体的颜色强度表示基因密度。The scale on the left represents chromosome length, and the color intensity of the chromosome represents gene density.

BPC2、*MsBBR-BPC4*、*MsBBR-BPC5*、*MsBBR-BPC7*、*MsBBR-BPC14*、*MsBBR-BPC15*;亚族Ⅱ中包含3个蛋白,分别为 *MsBBR-BPC9*、*MsBBR-BPC10*、*MsBBR-BPC16*;亚族Ⅴ中包含3个蛋白,分别为 *MsBBR-BPC11*、*MsBBR-BPC12*、*MsBBR-BPC13*;在亚族Ⅵ、亚族Ⅶ、亚族Ⅷ中,分别包含了 *MsBBR-BPC6*、*MsBBR-BPC3*、*MsBBR-BPC8*(图4)。

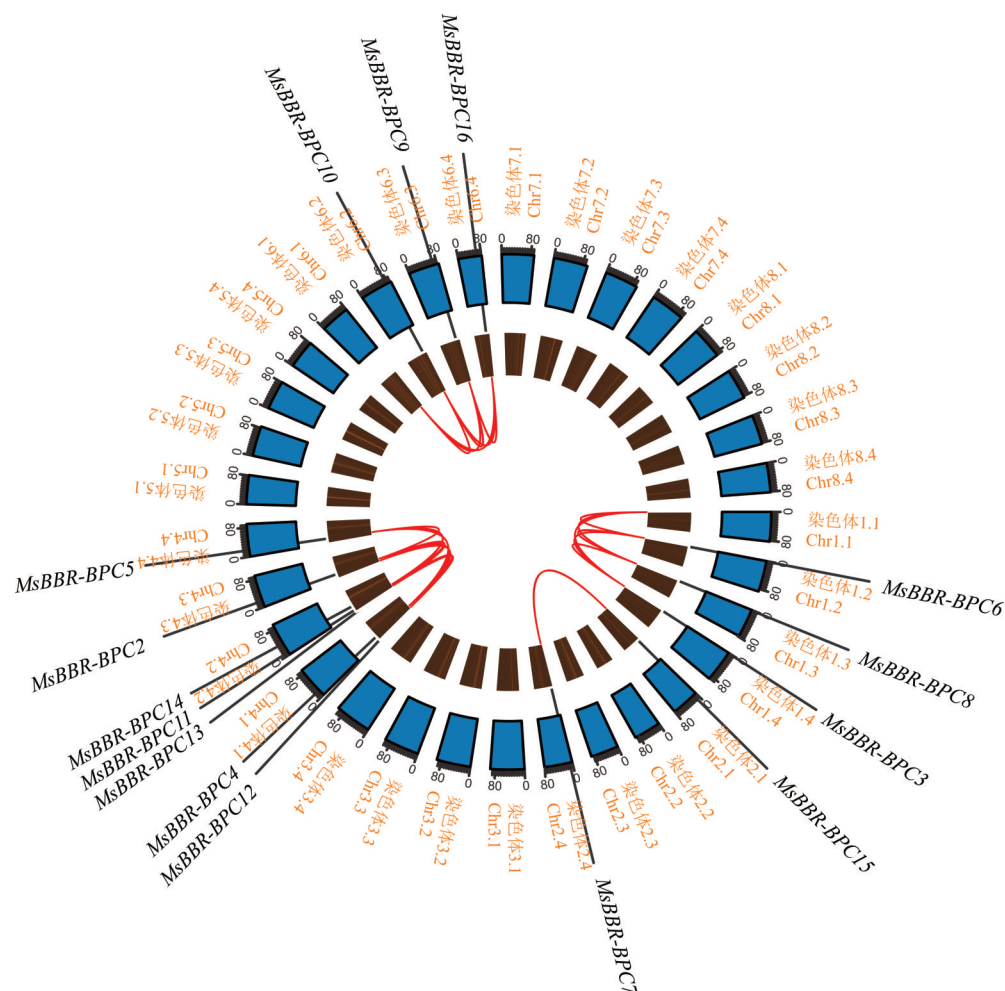


图2 *MsBBR-BPC* 基因在紫花苜蓿内的共线性分析

Fig. 2 Analysis of collinearity of *MsBBR-BPC* genes in alfalfa

片段重复的基因用红线连接。Segmentally duplicated genes are connected by red lines.

2.5 蛋白质保守基序和基因结构分析

为了探究 *MsBBR-BPC* 基因家族的保守性和进化趋势,分析了它们的保守基序和基因结构。通过 MEME 分析,将 *MsBBR-BPC* 基因家族分为 4 个亚家族,对保守基序的分析表明,同一亚家族中的成员具有相似的基序组成,而不同的亚家族则表现出不同的基序(图 5)。在 *MsBBR-BPC* 基因家族中有 6 个保守基序,命名为 motif 1~motif 6。其中 motif 1、motif 6 和 motif 2 在每个亚家族中皆存在,这表明它们具有不可或缺的作用。亚家族 2 共包含 6 个 motif;在亚家族 1 中, *MsBBR-BPC1* 缺少 motif 1 和 motif 2;基因亚族 3 则共同缺少 motif 1 和 motif 2;在基因亚族 4 中,每个基因成员只包含了 motif 1、motif 2、motif 6。这些结果表明,同一亚家族中的成员通常具有相似的基序,可能具有相似的基因功能。不同的基序排列或者基序数目,表明基因亚家族之间发挥着不同的作用,为基因多样性提供了解释。基因结构显示, *MsBBR-BPC* 家族成员大多都含有 1~2 个外显子,由一个较短的外显子和一个较长的外显子组成,这表明 *MsBBR-BPC* 基因家族的基因结构较为简单。

2.6 顺式作用元件分析

基因启动子的顺式作用元件在基因转录及表达中有着重要作用。为了分析 *MsBBR-BPC* 基因家族的启动子顺式作用元件,本研究提取了每个基因转录起始位点上游 2000 bp 的序列,鉴定出 25 种顺式作用元件,其功能包含光响应、损伤胁迫、组织表达、生长发育过程以及激素调控(图 6)。其中,与光响应有关的顺式作用元件有 7 种;与非生物胁迫响应有关的顺式作用元件有 7 种,包括低温响应元件、厌氧诱导元件、MYB 参与胁迫的结合位点

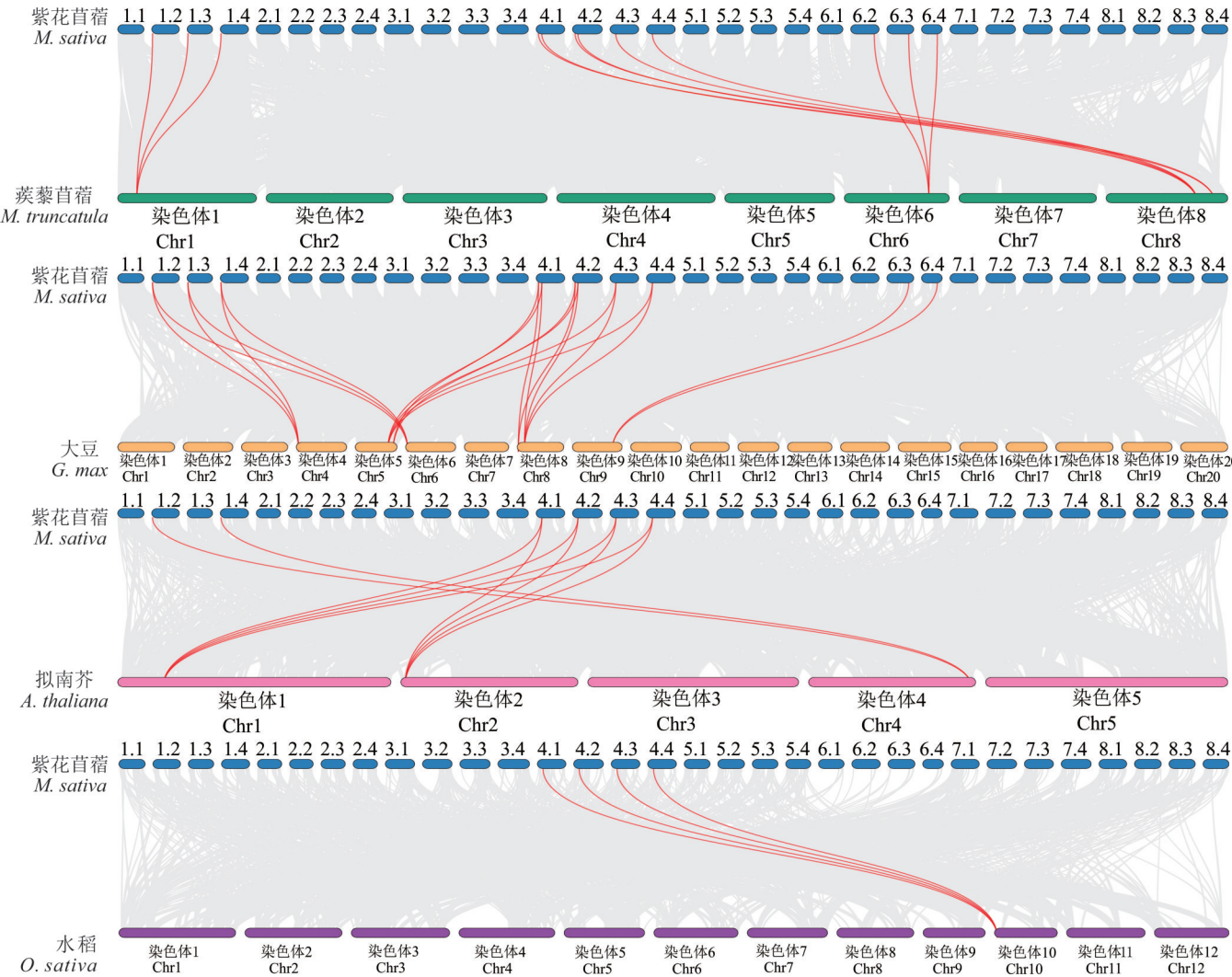


图 3 紫花苜蓿与多个物种间 *MsBBR-BPC* 基因的共线性分析

Fig. 3 Analysis of collinearity of *MsBBR-BPC* genes between alfalfa and multiple species

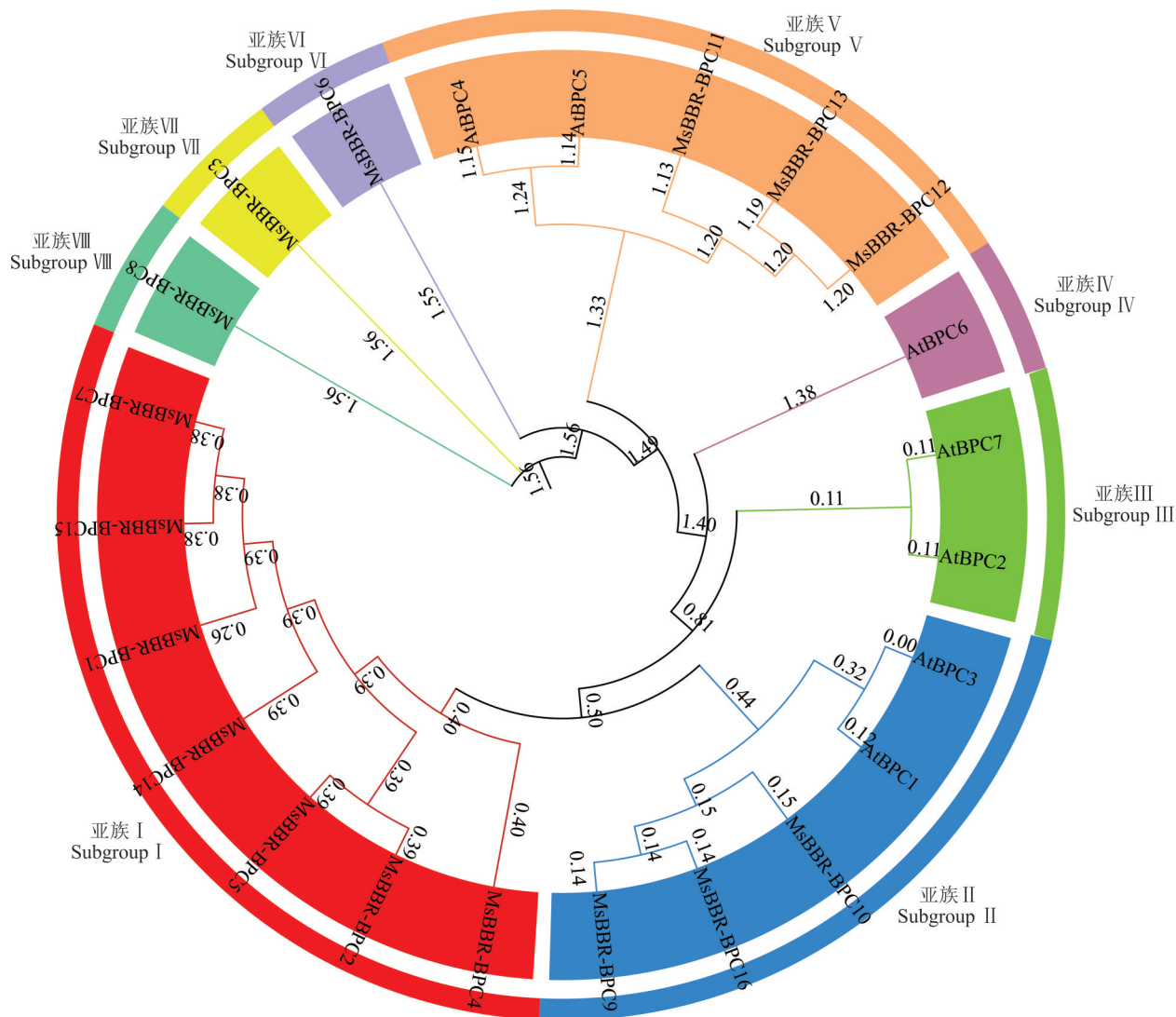
数字代表不同染色体。The numbers represent different chromosomes.

等;与激素调控有关的顺式作用元件有 5 种,包括水杨酸响应元件(TCA-element)、脱落酸响应元件(abscisic acid responsive element, ABRE)等;与种子生长发育有关的顺式作用元件有 4 种,值得注意的是具有 1 个参与昼夜周期调控的顺式作用元件和富含 AT 序列结合蛋白的结合位点,这起到介导转录抑制的作用。在基因家族中,光响应和胁迫响应元件各有 7 种,且每个基因至少有 1 个光响应元件和胁迫响应元件,这表明光可能是 *MsBBR-BPC* 基因家族表达的重要调控因子,同时推测每个基因都能在非生物胁迫中调节 ROS 平衡。

MsBBR-BPC 基因家族鉴定的顺式作用元件存在明显的差异。由于不同生长阶段、不同细胞和状态下的基因可能拥有不一样的调控机制,所以每个基因启动子包含了不同功能的顺式作用元件来响应外部胁迫或环境变化下的调控需求。

2.7 BBR-BPC 基因表达模式

2.7.1 BBR-BPC 基因在紫花苜蓿不同组织中的表达模式 为了解紫花苜蓿 *MsBBR-BPC* 基因家族在不同组织中(花、叶、根、茎、种子)的表达模式,对 *MsBBR-BPC* 基因家族进行 RT-qPCR 分析。结果表明,在 *MsBBR-BPC* 基因家族中,*MsBBR-BPC* 基因在根、茎和种子中相对转录丰度有着明显差异,其中 *MsBBR-BPC2*、*MsBBR-BPC6* 基因分别在紫花苜蓿的根、茎和种子中相对转录丰度最高。*MsBBR-BPC4* 基因在花、叶、根、茎和种子中的相对转录丰度呈上调趋势,在种子中达到峰值;*MsBBR-BPC1*、*MsBBR-BPC2*、*MsBBR-BPC6* 基因在花、叶、根、

图4 *MsBBR-BPC* 基因家族的系统发育树Fig. 4 Phylogenetic tree of the *MsBBR-BPC* gene family

茎、种子中的转录丰度呈现先上调后下调的趋势,在紫花苜蓿茎中的转录丰度显著高于其他组织($P < 0.05$);此外, *MsBBR-BPC3*、*MsBBR-BPC5*、*MsBBR-BPC7*、*MsBBR-BPC8*、*MsBBR-BPC10*、*MsBBR-BPC11*、*MsBBR-BPC12*、*MsBBR-BPC14*、*MsBBR-BPC15*、*MsBBR-BPC16* 基因的转录丰度则呈现先上调后下调再上调的趋势。*MsBBR-BPC3*、*MsBBR-BPC10*、*MsBBR-BPC12*、*MsBBR-BPC15* 基因在紫花苜蓿种子中的相对转录丰度显著高于其他组织($P < 0.05$,图7)。这表明不同基因在不同组织上有着不同的转录丰度。

2.7.2 BBR-BPC 基因家族成员响应种子老化的表达模式 本研究探讨了 *MsBBR-BPC* 基因家族在紫花苜蓿种子老化下种子吸胀萌发过程中的表达模式。结果发现, *MsBBR-BPC* 基因在紫花苜蓿不同活力水平下种子的吸胀萌发具有明显差异, *MsBBR-BPC10*、*MsBBR-BPC13*、*MsBBR-BPC16* 基因在种子老化 24 d 后显示高表达水平,这说明它们可能抑制了非生物胁迫下种子的老化过程, *MsBBR-BPC3*、*MsBBR-BPC4*、*MsBBR-BPC8* 基因在老化种子中则表现出低表达水平(图8A)。

为了探索可能调控种子活力的潜在候选基因,利用转录组数据对 *MsBBR-BPC* 基因家族在紫花苜蓿种子吸胀萌发中的表达模式进行进一步分析(图8B)。 *MsBBR-BPC2*、*MsBBR-BPC4*、*MsBBR-BPC5* 基因在正常种子萌发 6 h 均表现出高表达水平, *MsBBR-BPC9*、*MsBBR-BPC10*、*MsBBR-BPC15* 在正常种子中萌发 36 h 时表达水平下调。然而,在老化 8 d,种子吸胀 12 h 时, *MsBBR-BPC6*、*MsBBR-BPC15*、*MsBBR-BPC16* 基因表达水平上调;在

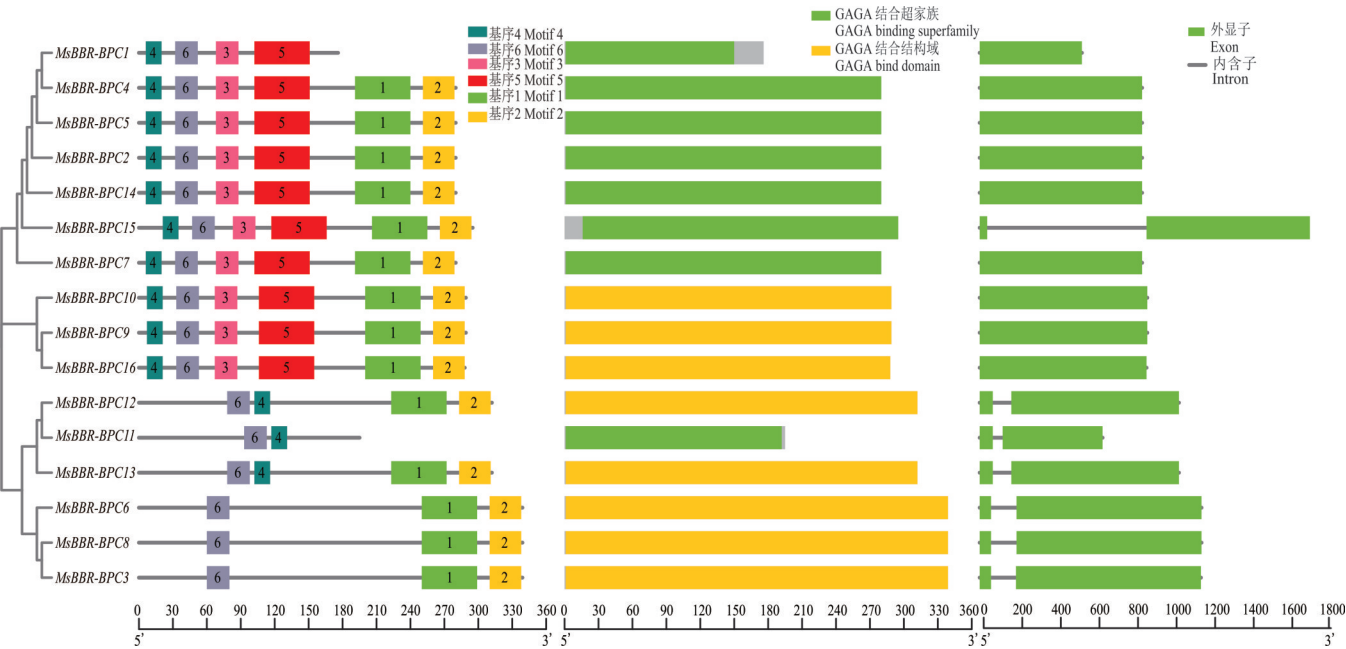


图5 *MsBBR-BPC* 基因家族的保守基序和基因结构分析
Fig. 5 Analysis of conserved motifs and gene structure of *MsBBR-BPC* gene family

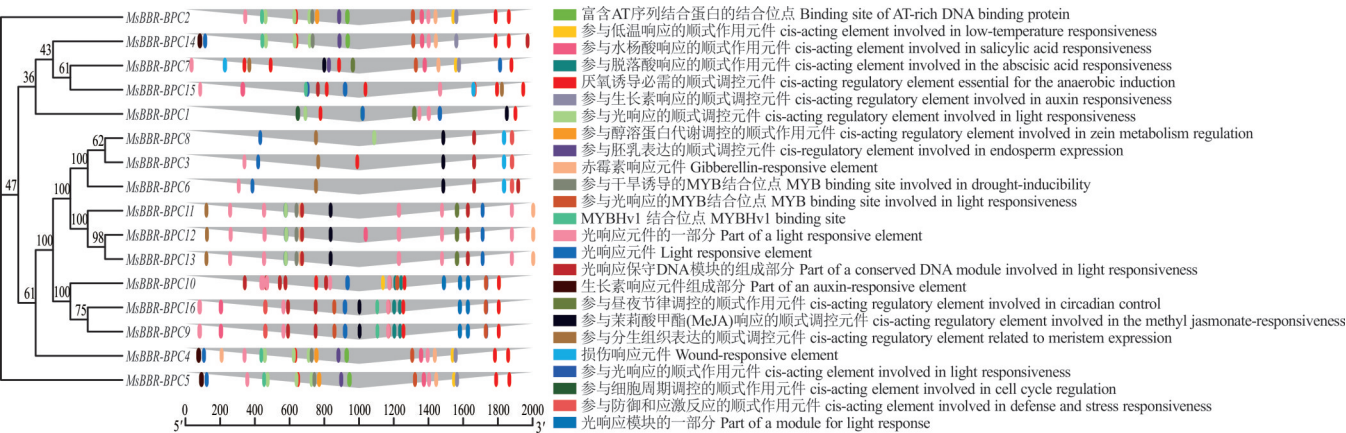


图6 *MsBBR-BPC* 基因顺式作用元件的分布
Fig. 6 Distribution of cis-acting elements in *MsBBR-BPC* gene

老化种子吸胀 24 h 时, *MsBBR-BPC12*、*MsBBR-BPC13* 基因表达水平上调。此外, *MsBBR-BPC* 基因家族在种子萌发过程中表达水平并非连续, 这说明特定时间基因才进行特定的表达。

2.8 *MsBBR-BPC* 蛋白互作网络

利用 STRING 数据库(<https://string-db.org/>)预测 *MsBBR-BPC* 蛋白的功能与联系, 以模式植物拟南芥为背景构建蛋白互作网络。结果显示, *MsBBR-BPC13* 蛋白与 3 种功能蛋白存在相似性; 此外, 除 Q8GYA5_ARATH 与 F24J8.17 蛋白功能不明确, *MsBBR-BPC16* 蛋白与其他 5 种蛋白之间存在潜在的互作关系。*MsBBR-BPC16* 与 *MsBBR-BPC11* 间存在较强的交互作用, 这表明它们可能拥有相似的调控机制(图 9)。*A8MQN6_ARATH* 蛋白在 PLATZ(plant A/T-rich protein and zinc-binding protein)转录因子家族中发挥作用, *ZHD3* 蛋白属于 *ZHD*(zinc finger homeodomain)转录因子家族, 它们在植物生长、发育和非生物胁迫响应中发挥着重要作用。*GPL3* 蛋白(GLABROUS1 enhancer-binding protein-like 3)参与应激反应。*PAT21* 蛋白(protein S-acyltransferase 21)参与蛋白质脂质修饰。*AGL11* 蛋白(agamous-like MADS-box protein)需要与 *TT16/AGL32*

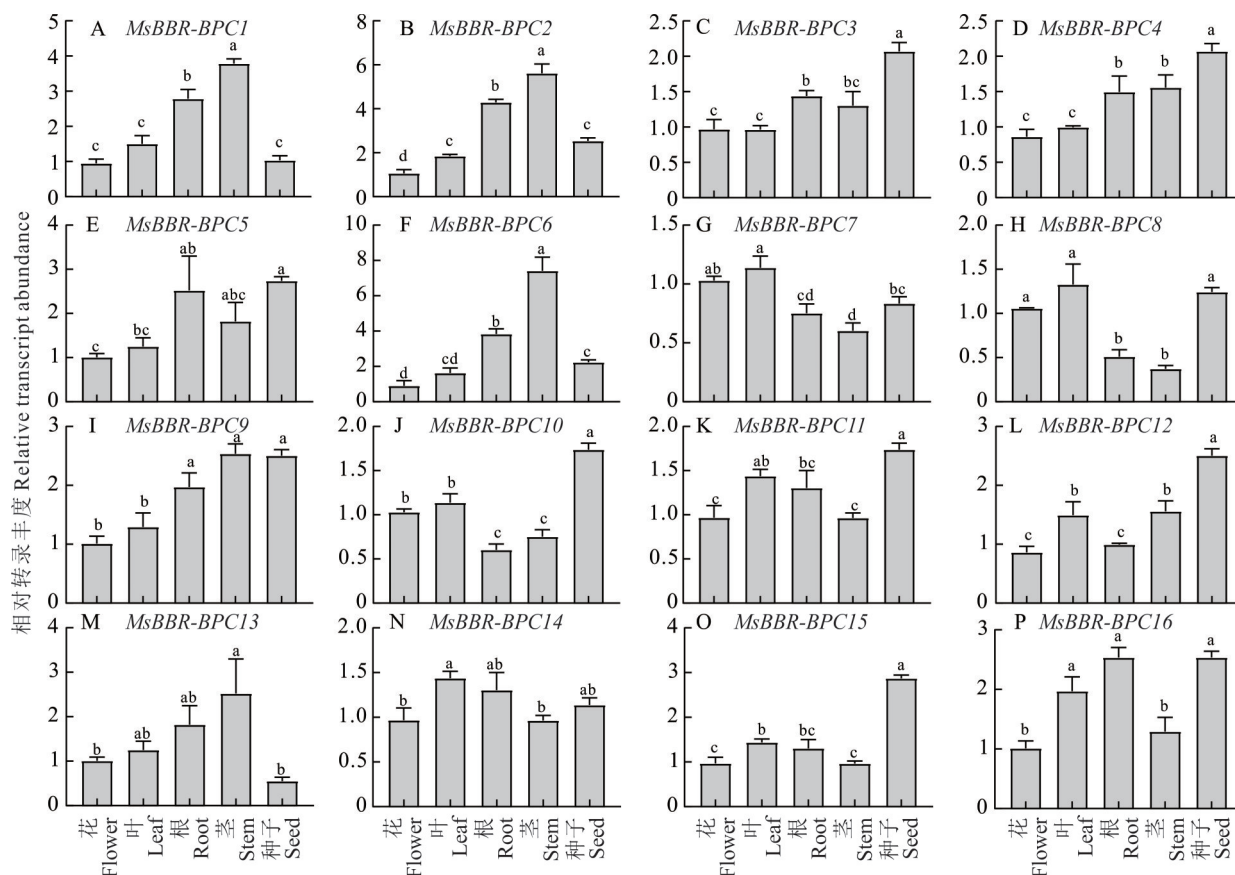


图7 *MsBBR-BPC* 基因在紫花苜蓿不同组织的表达分析

Fig. 7 Expression analysis of *MsBBR-BPC* genes in different tissues of alfalfa

不同小写字母表示不同组织的相对转录丰度差异显著 ($P < 0.05$)。Different lowercase letters in the figure indicate that the relative transcript abundances of different tissues are significantly different ($P < 0.05$).

一起用于母体控制内皮形成,这对于胚囊发育和受精以及种子形成至关重要。RALFL34 (rapid alkalization factor34)蛋白可能调节植物胁迫、生长和发育的细胞信号肽。AHL6 蛋白(AT-hook motif nuclear-localized protein 6)与核基质附着区(matrix attachment region)相关的富含AT的DNA序列存在特异性结合,这表明它同样具备调节植物生长发育,参与应激反应的功能。这说明 *MsBBR-BPC13*、*MsBBR-BPC16* 蛋白可能在调控种子活力方面有着至关重要的影响。

3 讨论

ROS被认为是种子萌发的调节剂,同时它也对种子活力有着深刻的影响^[23]。ROS积累过高时会导致种子内细胞重要物质(蛋白质、DNA、RNA等)的破坏性氧化。此外,ROS会使脂质过氧化和不饱和脂肪酸降解,产生丙二醛^[24],最终破坏种子结构从而使其活力下降^[25]。*BBR-BPC* 基因家族被发现已经在不少植物中发挥调节植物生长、昼夜节律调控和参与非生物胁迫反应等重要作用^[26]。尽管有了*BBR-BPC* 基因调控信息,但是在豆科植物中的研究甚少,因此分析*BBR-BPC* 基因家族在紫花苜蓿中的表达有着重要意义。

3.1 紫花苜蓿 *BBR-BPC* 家族成员全基因组水平鉴定及进化分析

有研究发现,玉米(*Zea mays*)中共鉴定到4个*BBR-BPC* 成员^[27],苹果(*Malus domestica*)中鉴定到6个成员^[28],由于谱系特异性扩展,不同物种的基因家族数目可能存在巨大差异^[29]。在本研究中,使用Blast和HMM法鉴定出紫花苜蓿中16个*BBR-BPC* 基因家族成员,这些*MsBBR-BPC* 基因在分子量、氨基酸序列长度和理论等电点上表现出差异,表明苜蓿基因组的复杂性和*MsBBR-BPC* 基因在应对不同生物和非生物胁迫时的功能差异。亚细胞定位预测表明*MsBBR-BPC* 基因成员皆位于细胞核中,强调了它们在细胞核中的潜在作用。

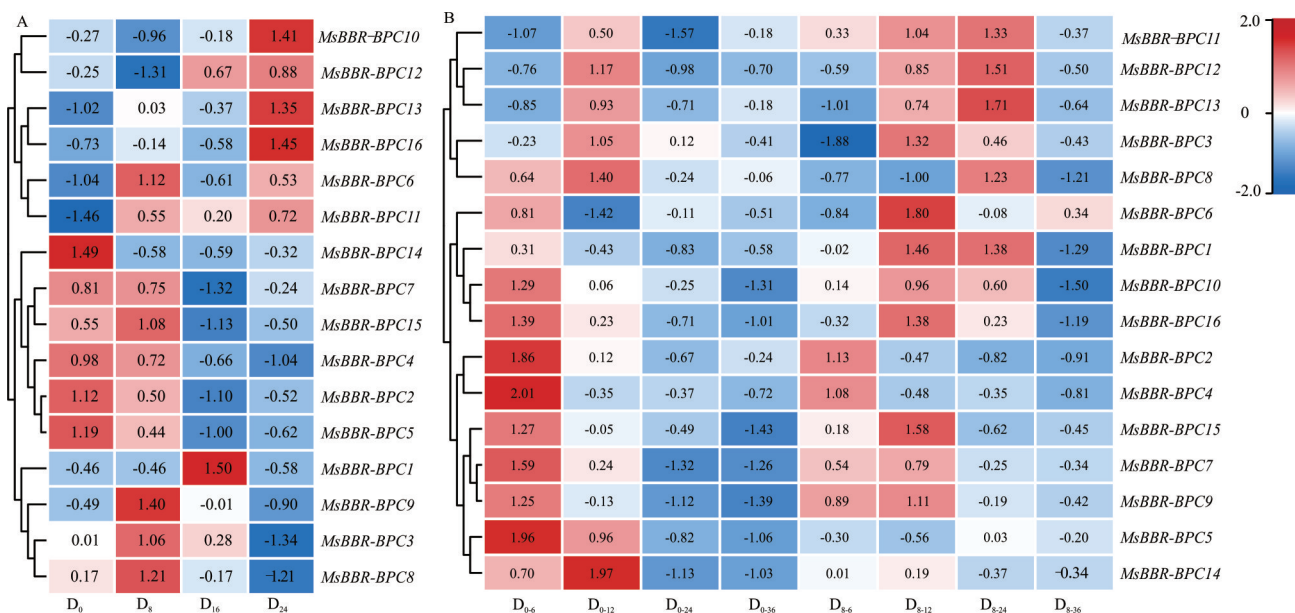


图 8 *MsBBR-BPC* 基因在不同活力水平下种子吸胀萌发过程中的表达模式

Fig. 8 Expression patterns of *MsBBR-BPC* genes during seed imbibition and germination at different vigor levels

A: *MsBBR-BPC* 基因在不同活力水平 D_0 、 D_8 、 D_{16} 和 D_{24} 种子中的表达模式 Expression patterns of *MsBBR-BPC* genes in seeds at different vigor levels at D_0 , D_8 , D_{16} , and D_{24} ; B: 吸胀 6、12、24、36 h 的紫花苜蓿种子中 16 个 *BBR-BPC* 基因的表达模式 Expression patterns of 16 *BBR-BPC* genes in alfalfa seeds at 6, 12, 24, and 36 hours of imbibition. 色标表示 $\log_{10}$ 的表达值。红色表示上调表达, 蓝色表示下调表达。The color scale indicates the $\log_{10}$ expression value. Red indicates up-regulated expression, and blue indicates down-regulated expression.

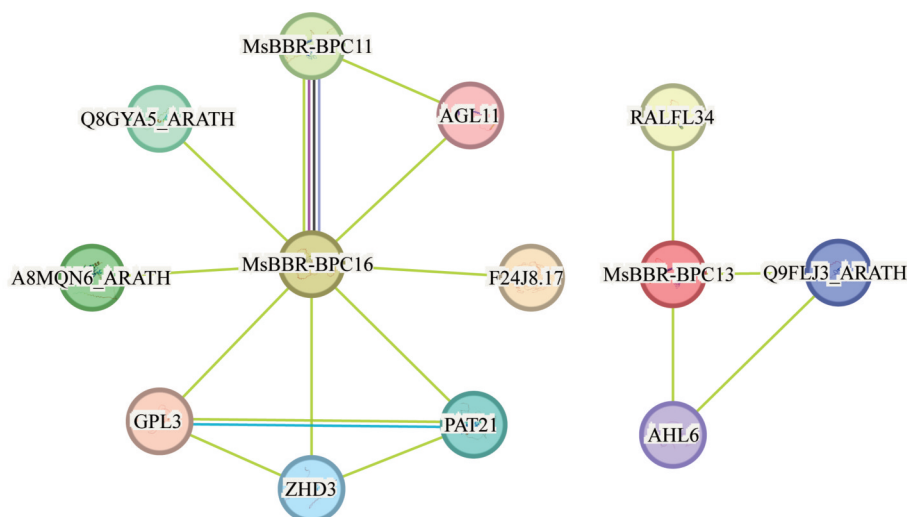


图 9 紫花苜蓿中 *MsBBR-BPC* 蛋白与拟南芥中相关蛋白的互作网络

Fig. 9 Interaction network between *MsBBR-BPC* proteins in alfalfa and related proteins in Arabidopsis

线条越多代表关联越强。The more lines, the stronger the relationship.

通过系统发育树发现, 紫花苜蓿 *BBR-BPC* 家族成员主要分布在 3 个亚族内, 同一个亚族中基因一般具有较为相似的功能^[30]。且每个亚族中都可能存在具有代表性的拟南芥 *AtBPC* 基因, 例如, *AtBPC1*、*AtBPC4*、*AtBPC5* 基因作用于胚珠发育、植物形态特征^[12, 14–15]; *AtBPC3* 在调节开花过程、昼夜节律变化和盐胁迫中有重要作用^[10, 18], 这说明 *BBR-BPC* 基因家族存在高度的保守性; 此外 *MsBBR-BPC* 基因家族同时独立拥有其他亚族, 在不同物种内, 它们也具备独有的进化关系。基因复制是物种进化和基因家族扩展的重要推动因素^[31], 根据染色体定位发现, *MsBBR-BPC* 基因家族不均匀的分布在 13 个染色体上, 这与进化过程中染色体发生变异有关^[32]。甘蓝型油菜

(*Brassica napus*)在种间共有21对共线基因^[33],多基因家族通过基因片段复制产生^[34],本研究中*MsBBR-BPC*基因家族广泛存在基因片段重复,这有利于新基因功能的产生,说明片段重复可能在*MsBBR-BPC*基因家族中发挥举足轻重的作用,有可能增加突变概率和环境适应性。

*MsBBR-BPC*基因在保守基序和基因结构的差异,在一定范围内诠释了基因家族的进化趋势。motif 6在所有基因中共享,这显示了它在维持*MsBBR-BPC*基因功能方面无可比拟的作用。此外,通过MEME分析将*MsBBR-BPC*基因家族分为4个亚族,每个亚族具有不同的基序,然而亚族中其保守序列基本一致,这意味着它们可能在对非生物胁迫的反应中发挥复杂多样的作用。*MsBBR-BPC*基因结构简单,大部分基因成员均无内含子,只包括1~2个外显子。内含子的变异是基因变化的主要因素,其中包含了内含子的缺失^[34];外显子可通过提供转录调控元件的结合位点,促进调控元件与编码序列的相互作用,从而使植物对生长发育信号或非生物胁迫做出迅速的基因表达响应^[35]。

3.2 *BBR-BPC*家族成员启动子顺式作用元件预测

顺式作用元件的类型和数量在植物中的调控作用至关重要^[36]。以往的研究证实了BBR-BPC蛋白的功能多样性,暗示其在调节植物生长和逆境反应中发挥重要作用^[17]。对*MsBBR-BPC*基因家族的顺式作用元件进行分析,鉴定出25种在生长发育、应激反应和激素反应功能方面不同程度富集的元素。其中光响应、应激反应和激素反应功能元件占据主要地位。同时低温响应元件与盐碱胁迫有着密切联系,脱落酸响应元件受到干旱胁迫的诱导^[37-38]。并且还存在着昼夜节律调控元件和种子发育响应元件,这表明*MsBBR-BPC*基因家族存在复杂的调控机制。根据顺式作用元件推测紫花苜蓿中的BBR-BPC蛋白可能参与3个调控途径。首先,它们可能参与了紫花苜蓿对非生物胁迫的反应。其次,它们可能在叶绿素合成和叶绿体发育的调控中发挥作用。最后,BBR-BPC蛋白可能参与调控紫花苜蓿种子活力的机制,从而影响植物的生长发育。

3.3 潜在调控种子活力的*BBR-BPC*家族成员挖掘

通过对紫花苜蓿进行RT-qPCR的深入分析发现,组织特异性表达模式对于揭示*MsBBR-BPC*基因在不同组织中的特定作用关系重大。研究结果显示了不同组织中*MsBBR-BPC*基因的转录丰度。其中*MsBBR-BPC3*、*MsBBR-BPC5*、*MsBBR-BPC10*、*MsBBR-BPC12*、*MsBBR-BPC15*基因在紫花苜蓿种子中的相对转录丰度显著高于其他组织($P < 0.05$),每个基因在不同组织中的相对转录丰度存在规律性的变化。*MsBBR-BPC*蛋白可能参与非生物胁迫过程反应与种子活力的调控。为了进一步了解其表达模式,本研究利用转录组分析检测了不同活力种子在吸胀萌发过程中的表达模式,为*MsBBR-BPC*基因在胁迫作用下种子活力的调控作用提供新的发现。与其他基因相比,*MsBBR-BPC10*、*MsBBR-BPC13*、*MsBBR-BPC16*基因在老化种子中高水平表达;种子老化8 d后,吸胀12 h时,*MsBBR-BPC6*、*MsBBR-BPC15*、*MsBBR-BPC16*基因的表达水平上调;在老化种子吸胀24 h时,*MsBBR-BPC12*、*MsBBR-BPC13*基因呈现高表达水平。根据蛋白互作网络分析,*MsBBR-BPC13*、*MsBBR-BPC16*蛋白可能存在调节胁迫植物ROS平衡与植物生长发育的功能,这表明它们在种子老化过程中发挥着潜在的调控作用。

*BBR-BPC*基因家族鉴定最早在拟南芥中报道^[8],近年来对其功能机制的研究也逐渐深入。然而相关紫花苜蓿种子活力的复杂调控机制仍需要进一步阐明。因此,未来对个体*MsBBR-BPC*基因的进一步研究非常必要。*MsBBR-BPC10*、*MsBBR-BPC13*、*MsBBR-BPC16*基因可能参与紫花苜蓿种子老化及活力的调控。验证揭示个体*MsBBR-BPC*基因的具体功能将有助于进一步了解紫花苜蓿种子活力的分子调控机制,为改善紫花苜蓿种子老化提供研究基础。

4 结论

本研究从“新疆大叶”紫花苜蓿中成功鉴定到16个*MsBBR-BPC*基因,并将其定位到13条染色体上。系统发育分析将*MsBBR-BPC*基因家族分为8个亚家族,其具有较高的保守性。共线性分析表明,片段重复是该基因家族扩增中重要的驱动力。*MsBBR-BPC*基因家族成员启动子区域含有参与光响应、损伤胁迫、组织表达、生长发育过程以及激素调控相关的顺式作用元件。通过转录组分析,挖掘到*MsBBR-BPC10*、*MsBBR-BPC13*和

MsBBR-BPC16 基因响应种子老化以及潜在参与种子活力调控的 *MsBBR-BPC* 基因。同时经蛋白预测网络发现 *MsBBR-BPC16* 蛋白与 *AGL11*、*PAT21*、*ZHD3* 和 *GPL3* 蛋白存在一定的潜在互作关系, *MsBBR-BPC16* 与 *MsBBR-BPC11* 有较强的交互作用。本研究从紫花苜蓿中系统鉴定了 *MsBBR-BPC* 基因家族, 挖掘到 3 个响应种子老化、潜在参与种子活力调控的 *MsBBR-BPC* 基因, 但是还需进一步的研究来阐明其调控种子活力的确切途径, 蛋白之间的互作关系也同样需要相关试验进行验证。

参考文献 References:

- [1] Ge R, Luo Y J, Li Q, *et al.* Identification of key modules and candidate genes for seed aging resistance of *Oryza sativa* subsp. *indica* Kato. *Seed*, 2024, 43(10): 1–12.
葛蓉, 罗永坚, 李清, 等. 籼稻种子抗老化关键模块及候选基因的鉴定. *种子*, 2024, 43(10): 1–12.
- [2] McDonald M B. Seed deterioration: physiology, repair and assessment. *Seed Science and Technology*, 1999, 27(1): 177–237.
- [3] Ebone L A N, Caverzan A, Chavarria G. Physiologic alterations in orthodox seeds due to deterioration processes. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2019, 145: 34–42.
- [4] Zhang K L, Zhang Y, Sun J, *et al.* Deterioration of orthodox seeds during ageing: influencing factors, physiological alterations and the role of reactive oxygen species. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2021, 158: 475–485.
- [5] Tan S Y, Cao J, Li S C, *et al.* Unraveling the mechanistic basis for control of seed longevity. *Plants*, 2025, 14(5): 805.
- [6] Sun S J, Ma W, Jia Z C, *et al.* Genomic identification and expression profiling of lesion simulating disease genes in alfalfa (*Medicago sativa*) elucidate their responsiveness to seed vigor. *Antioxidants*, 2023, 12(9): 1768.
- [7] Sangwan I, O'Brian M R. Identification of a soybean protein that interacts with *GAGA* element dinucleotide repeat DNA. *Plant Physiology*, 2002, 129(4): 1788–1794.
- [8] Santi L, Wang Y M, Stile M R, *et al.* The GA octodinucleotide repeat binding factor *BBR* participates in the transcriptional regulation of the homeobox gene *Bkn3*. *The Plant Journal*, 2003, 34(6): 813–826.
- [9] Meister R J, Williams L A, Monfared M M, *et al.* Definition and interactions of a positive regulatory element of the *Arabidopsis* INNER NO OUTER promoter. *The Plant Journal*, 2004, 37(3): 426–438.
- [10] Lee Y, Tsai P, Huang X, *et al.* Family members additively repress the ectopic expression of *BASIC PENTACYSTEINE3* to prevent disorders in *Arabidopsis* circadian vegetative development. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: DOI: 10.3389/fpls.2022.919946.
- [11] Sun H, Pang B, Yan J, *et al.* Comprehensive analysis of cucumber gibberellin oxidase family genes and functional characterization of *CsGA20ox1* in root development in *Arabidopsis*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(10): 3135.
- [12] Monfared M M, Simon M K, Meister R J, *et al.* Overlapping and antagonistic activities of *BASIC PENTACYSTEINE* genes affect a range of developmental processes in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 2011, 66(6): 1020–1031.
- [13] Gong R, Cao H, Zhang J, *et al.* Divergent functions of the *GAGA-binding* transcription factor family in rice. *The Plant Journal*, 2018, 94(1): 32–47.
- [14] Li S, Miao L, Huang B, *et al.* Genome-wide identification and characterization of cucumber *BPC* transcription factors and their responses to abiotic stresses and exogenous phytohormones. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(20): 5048.
- [15] Ma X, Yu Y, Hu Z, *et al.* Characterizations of a class-i *BASIC PENTACYSTEINE* gene reveal conserved roles in the transcriptional repression of genes involved in seed development. *Current Issues in Molecular Biology*, 2022, 44(9): 4059–4069.
- [16] Simonini S, Kater M M. Class I *BASIC PENTACYSTEINE* factors regulate *HOMEODOMAIN* genes involved in meristem size maintenance. *Journal of Experimental Botany*, 2014, 65(6): 1455–1465.
- [17] Petrella R, Caselli F, Villanova I R, *et al.* *BPC* transcription factors and a polycomb group protein confine the expression of the ovule identity gene *SEEDSTICK* in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 2020, 102(3): 582–599.
- [18] Yan J, Liu Y, Yang L, *et al.* Cell wall β -1,4-galactan regulated by the *BPC1/BPC2-GALS1* module aggravates salt sensitivity in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant*, 2021, 14(3): 411–425.
- [19] Zhou X Y, Jiang Q X, Jia H L, *et al.* Cloning and salt-tolerance functional analysis of alfalfa *MsBBX20* gene. *Acta Prataculturae Sinica*, 2024, 33(10): 55–73.
周昕越, 蒋庆雪, 贾会丽, 等. 紫花苜蓿 *MsBBX20* 基因克隆及耐盐功能分析. *草业学报*, 2024, 33(10): 55–73.

- [20] Chen C, Wu Y, Li J, *et al.* TBtools- II : a “one for all, all for one” bioinformatics platform for biological big-data mining. *Molecular Plant*, 2023, 16(11): 1733–1742.
- [21] Kumar S, Stecher G, Li M, *et al.* MEGA x: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 2018, 35(6): 1547–1549.
- [22] Zhang Y, Liu H, Ma X, *et al.* Genome-wide identification and expression analysis of the class III peroxidase gene (*PRXIII*) family in *Medicago sativa* L. and its function in the abiotic stress response. *BMC Plant Biology*, 2025, 25(1): 1–15.
- [23] Kumar S P J, Prasad S R, Banerjee R, *et al.* Seed birth to death: dual functions of reactive oxygen species in seed physiology. *Annals of Botany*, 2015, 116(4): 663–668.
- [24] Rajjou L C, Lovigny Y, Groot S P C, *et al.* Proteome-wide characterization of seed aging in *Arabidopsis*: a comparison between artificial and natural aging protocols? *Plant Physiology*, 2008, 148(1): 620–641.
- [25] Groot S P C, Surki A A, de Vos R C H, *et al.* Seed storage at elevated partial pressure of oxygen, a fast method for analysing seed ageing under dry conditions. *Annals of Botany*, 2012, 110(6): 1149–1159.
- [26] Strader L, Weijers D, Wagner D. Plant transcription factors-being in the right place with the right company. *Current Opinion in Plant Biology*, 2022, 65: 102136.
- [27] Zhao D B, Guan P Y, Guo Z H, *et al.* Genome-wide identification and expression analysis of maize *BBR-BPC* gene family. *Journal of Maize Sciences*, 2023, 31(3): 58–66.
赵东波, 管培燕, 郭智慧, 等. 玉米 *BBR-BPC* 基因家族全基因组鉴定及表达分析. *玉米科学*, 2023, 31(3): 58–66.
- [28] Zhao H Y. Molecular mechanism of apple *BBR/BPC* transcription factor *MdBPC2* on regulating plant growth. Yangling: Northwest A&F University, 2023.
赵海艳. 苹果 *BBR/BPC* 转录因子 *MdBPC2* 在调控植株生长中的功能研究. 杨凌: 西北农林科技大学, 2023.
- [29] Lespinet O, Wolf Y I, Koonin E V, *et al.* The role of lineage-specific gene family expansion in the evolution of *Eukaryotes*. *Genome Research*, 2002, 12(7): 1048–1059.
- [30] Panchy N, Lehti-Shiu M, Shiu S. Evolution of gene duplication in plants. *Plant Physiology*, 2016, 171(4): 2294–2316.
- [31] Birchler J A, Yang H. The multiple fates of gene duplications: deletion, hypofunctionalization, subfunctionalization, neofunctionalization, dosage balance constraints, and neutral variation. *The Plant Cell*, 2022, 34(7): 2466–2474.
- [32] Wang Z Y, Zhao S, Liu J F, *et al.* Genome-wide identification of tomato golden 2-like transcription factors and abiotic stress related members screening. *BMC Plant Biology*, 2022, 22(1): 82.
- [33] Wang L, Chen W, Zhao Z, *et al.* Genome-wide identification, conservation, and expression pattern analyses of the *BBR-BPC* gene family under abiotic stress in *Brassica napus* L. *Genes*, 2024, 16(1): 36.
- [34] Rogozin I B, Carmel L, Csuros M, *et al.* Origin and evolution of spliceosomal introns. *Biology Direct*, 2012, 7(1): 36.
- [35] Wen X Y, Zhao Y, Wang B Q, *et al.* Expression analysis of *AP2/ERFs* genes in alfalfa regulated by exogenous NO under drought stress. *Acta Prataculturae Sinica*, 2025, 34(6): 154–167.
温小月, 赵颖, 王宝强, 等. 外源 NO 调控干旱胁迫下紫花苜蓿 *AP2/ERFs* 基因的表达分析. *草业学报*, 2025, 34(6): 154–167.
- [36] Cantalapiedra C P, Hernández-Plaza A, Letunic I, *et al.* EggNOG-mapper v2: functional annotation, orthology assignments, and domain prediction at the metagenomic scale. *Molecular Biology and Evolution*, 2021, 38(12): 5825–5829.
- [37] Zhang X Y, Zhao L J, Li Y J, *et al.* Expression of *AtPUB18* after salt stress treatment and analysis of its promoter from *Arabidopsis thaliana*. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2014, 34(1): 54–59.
张新宇, 赵兰杰, 李艳军, 等. 盐胁迫对拟南芥 *AtPUB18* 基因的诱导表达及其启动子分析. *西北植物学报*, 2014, 34(1): 54–59.
- [38] Lee S, Kim S, Kim S. Drought inducible *OsDhn1* promoter is activated by *OsDREB1a* and *OsDREB1d*. *Journal of Plant Biology*, 2013, 56(2): 115–121.