

BnaHKL1基因过量表达与转基因油菜叶片中可溶性糖的变化

刘佳桢^{1,2}, 钟微^{1,2}, 杨慧^{1,2}, 田闵玉^{1,2}, 阮颖^{1,2}, 刘春林^{1,2*}

¹湖南农业大学, 作物表观遗传调控与发育湖南省重点实验室, 湖南 长沙

²岳麓山实验室, 湖南 长沙

收稿日期: 2024年11月5日; 录用日期: 2024年12月4日; 发布日期: 2024年12月12日

摘要

本研究构建了甘蓝型油菜BnaHKL1基因的过量表达载体pFGC5941-BnaHKL1, 并采用根癌农杆菌介导的方法对甘蓝型油菜湘油15 (XY15)的下胚轴外植体进行转化。通过PCR鉴定, 成功获得34株抗性植株, 其中11株是具有基因过量表达的转基因植株。半定量RT-PCR分析结果表明, 过表达转基因植株中BnaHKL1基因的表达水平显著高于XY15中的表达水平。与XY15相比, BnaHKL1过表达植株的淀粉含量显著降低, 而蔗糖、可溶性糖和果聚糖的含量则显著升高。

关键词

HKL1, 过量表达, 转基因植株, 可溶性糖

Overexpression of the BnaHKL1 Gene and Changes in Soluble Sugars in the Leaf Tissues of Transgenic Rapeseed

Jiazhen Liu^{1,2}, Wei Zhong^{1,2}, Hui Yang^{1,2}, Minyu Tian^{1,2}, Ying Ruan^{1,2}, Chunlin Liu^{1,2*}

¹Hunan Provincial Key Laboratory of Crop Epigenetic Regulation and Development, Hunan Agricultural University, Changsha Hunan

²Yuelu Mountain Laboratory, Changsha Hunan

Received: Nov. 5th, 2024; accepted: Dec. 4th, 2024; published: Dec. 12th, 2024

*通讯作者。

文章引用: 刘佳桢, 钟微, 杨慧, 田闵玉, 阮颖, 刘春林. BnaHKL1 基因过量表达与转基因油菜叶片中可溶性糖的变化[J]. 农业科学, 2024, 14(12): 1307-1315. DOI: 10.12677/hjas.2024.1412165

Abstract

In this study, the overexpression vector pFGC5941-BnaHKL1 of the BnaHKL1 gene from *Brassica napus* was constructed, and the hypocotyl explants of *Brassica napus* Xiangyou 15 (XY15) were transformed by the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated method. Through PCR identification, 34 resistant positive plants were successfully obtained, among which 11 were transgenic plants with overexpression cassette of the BnaHKL1 gene. The results of semi-quantitative RT-PCR analysis indicated that the expression level of the BnaHKL1 gene in the overexpression transgenic plants was significantly higher than that in XY15. Compared with XY15, the starch content in BnaHKL1 overexpression plants was significantly decreased, whereas the contents of sucrose, soluble sugars, and fructan were significantly increased.

Keywords

HKL1, Overexpression, Transgenic Plants, Soluble Sugars

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

油菜, 是十字花科(*Cruciferae*)芸薹属(*Brassica*)以菜籽榨油为主要种植目的的一年生或越年生草本植物的通称。甘蓝型油菜(*Brassica napus* L.)是全球重要的油料作物之一, 也是我国主要的经济作物, 年种植面积约 1 亿亩[1], 年产菜籽油约 500 万吨, 占国产植物油总量的 50%左右。目前, 在国内广泛种植经过改良的“双低”油菜中, 油酸(单不饱和脂肪酸)含量达 60%以上, 亚油酸和亚麻酸(多不饱和脂肪酸)比例最接近人体需要的比例, 且富含维生素 E、菜籽甾醇、菜油甾醇和豆甾醇, 是权威油脂健康专家组认定的“最健康的大宗食物油”[2]。

在油菜生长发育过程中, 常常受到干旱、低温、盐渍等多种非生物环境胁迫的影响, 从而引发体内一系列生理和生化代谢反应, 这些反应会影响植株正常的代谢与生长, 不利于营养体的发育, 严重时甚至导致不可逆损害, 并最终造成作物死亡[3]。其中, 目前低温胁迫是限制“稻油”“稻稻油”多熟制种植模式发展的主要因素。在多熟制模式下需要选择发育进展更快的早熟、超早熟油菜, 早熟油菜易早薹早花, 遭遇春冻极易导致叶片受冻, 花蕾闭蕾、死蕾, 花朵畸形, 花序死亡, 角果空瘪等, 最终造成产量损失[4]。因此, 促进油菜生产的健康发展, 最有效的方法就是开展油菜耐低温的机理研究, 提高油菜的抗寒能力, 培育高耐受性的油菜新品种, 选育各生育期均具有强低温抗性的油菜品种, 减少油菜因低温胁迫造成的损失[5][6]。

近年来, 关于油菜抗寒基因及其调控机制的研究取得了一定的进展。Raza 等[7]对甘蓝型油菜低温胁迫反应的全基因组转录因子分析, 超过 400 个 TFs 在冷应激反应中有差异表达, 其中有 25 个 TFs 在总 DEGs 中的表达量极高; 利用转录组的方法在白菜型油菜中鉴定出 136 个推断的 bZIP 转录因子, 其中 6 个基因可能与低温胁迫反应有关[8]; 油菜基因型中的低温胁迫响应基因、代谢物和代谢途径, 发现大多数 DEGs 和差异积累的代谢物参与淀粉和蔗糖代谢以及苯丙氨酸代谢进行了组学研究, 这些研究为深入探究油菜的抗寒性机制提供了重要的参考[9]-[11]。在冷响应表达的基因中, 与糖代谢相关的酶基因也较

多[12]-[15]。

在拟南芥中,己糖激酶样基因 *AtHKL1* 在低温胁迫下被诱导表达,并迅速激活以应对低温条件。目前,对油菜 *HKL1* 基因相关报道极少,多集中在对其逆境胁迫的应答及分子机制方面,尚未有将 *HKL1* 基因转入油菜的效果报道[16] [17]。为此,本研究构建了甘蓝型油菜 *BnaHKL1* 基因过量表达载体 *pFGC5941-BnaHKL1*,并采用农杆菌介导法将该载体转入甘蓝型油菜“XY15”品系的基因组中,以获得基因过量表达植株[18]-[21]。以糖含量变化作为抗性参考指标,比较了转基因油菜与野生型油菜在低温胁迫条件下糖含量的变化[22]。这为进一步研究该基因的功能奠定了基础,同时也为 *HKL1* 基因在油菜分子育种中的应用提供了理论依据。

2. 材料与方法

2.1. 材料

甘蓝型油菜材料“XY15”种子来自于湖南农业大学作物表观遗传调控与发育重点实验室。大肠杆菌 *DH5 α* 感受态由本实验室保存,植物表达载体 *pFGC5941* 由本实验室提供。

2.2. 方法

2.2.1. 过量表达载体构建

以甘蓝型油菜 cDNA 为模板,构建反应体系如下: cDNA (300 ng) 1 μ L、Phanta Max Super - Fidelity DNA Polymerase 1 μ L、2 $\times$ Phanta Buffer 25 μ L、dNTP Mix 1 μ L、引物 F (10 μ M) 0.5 μ L、引物 R (10 μ M) 0.5 μ L 以及 ddH₂O 21 μ L,总体积为 50 μ L。PCR 反应条件设置为:预变性 95 $^{\circ}$ C,持续 3 分钟;变性 95 $^{\circ}$ C,15 秒;退火 62 $^{\circ}$ C,15 秒;延伸 72 $^{\circ}$ C,45 秒;最终延伸 72 $^{\circ}$ C,5 分钟,共进行 34 个循环。使用引物 *Bna-C-F*(5'TGAGCGAACCATGCATTCAA3')和 *Bna-C-R*(5'TGACCGAACCATGCATATCCGA3')扩增带有酶切位点的 *BnaHKL1* CDS 片段。

通过胶回收试剂盒回收目标片段,并将回收的片段连接到 *pEASY* 载体上,然后转化到大肠杆菌 *DH5 α* 感受态细胞中。涂抹到带有卡那霉素(Kan)的筛选培养基上,挑单菌落,根据以下反应体系进行菌落 PCR 验证:单菌落/菌液/DNA 1 μ L、2 $\times$ Rapid Taq Master Mix 7.5 μ L,引物 F (10 μ M) 0.2 μ L,引物 R (10 μ M) 0.2 μ L,以及 ddH₂O 6.1 μ L,总体积 15 μ L。PCR 条件与前述相同,仅改变引物为 35S-F (CTATCCTTCG-CAAGACCCTTC)和 *Bna-C-R*,以确认转化成功样品。测序结果显示正确的,则进一步扩大培养后,用质粒提取试剂盒提取带目标片段的 *pEASY-BnaHKL1* CDS 质粒用于下一步。

在提取质粒后,根据以下酶切反应体系酶切与连接:质粒(1 ng) μ L, 10 $\times$ buffer 2 μ L, 酶 1 (*Sma*I)约 0.5 μ L, 酶 2 (*Sma*I)约 0.5 μ L 及 ddH₂O 至 20 μ L。其中,对 *pEASY-BnaHKL1* CDS 和 *pFGC5941* 进行双酶切分别回收需要的片段;将大小正确片段再通过 T4 连接酶完成连接后,用 *DH5 α* 感受态细胞转化大肠杆菌。同样挑选单菌落验证,如与预期一致,即对检验合格的阳性株送去测序,对比分析测序结果。如确认无误,即可扩大培养并从中提取质粒。测序由北京擎科生物科技股份有限公司完成。

2.2.2. 根癌农杆菌转化

采用电击转化法,将过表达载体 *pFGC5941-BnaHKL1* 质粒转化至根癌农杆菌 *GV3101* 中。随后,将转化后的菌株涂布于含有 50 μ g $\cdot$ mL⁻¹卡那霉素、50 μ g $\cdot$ mL⁻¹利福平和 50 μ g $\cdot$ mL⁻¹庆大霉素的培养基上,以筛选阳性菌株。将平板放置于 28 $^{\circ}$ C 摇床中培养 2~3 天后,挑取单个菌落进行阳性克隆的鉴定。

2.2.3. 遗传转化油菜

(1) 种子的消毒与播种:在生物安全柜中进行全程无菌操作。使用 75%酒精及 0.1%升汞溶液消毒种

子,并浸泡后用灭菌水冲洗干净。将灭菌种子点播在 M0 培养基上,在 24℃ 暗培养 6 天。

(2) 浸染菌的制备:转化农杆菌并 PCR 确认目标克隆,然后 OD600 达到 0.3~0.5 时重悬于 DM 培养基中,经离心处理再次重悬,再放入 28℃ 摇床培育。

(3) 外植体准备与浸染:切取下胚轴,用 DM 培养基保持湿润,在重悬菌液中浸染 15 分钟。同时需要轻摇确保接触充分。之后去除多余的菌液,用滤纸吸走残留部分。

(4) 外植体共培养:外植体置于 M1 培养基中,共培育 40~48 小时以促使浸染(观察有明显白色菌点应立即转出)。

(5) 初步诱导筛选:将外植体转至 M2 进行光照处理 20 天直到出现绿色组织,每隔一定时间更换新鲜介质以提高效率。

(6) 愈伤组织再生:当外植体在 M2 中明显分化且呈绿色时才能转入 M3,每 14 天继代一次直至出现绿芽,如未产生可选择性放弃该外植体。

(7) 再生植株的生根、炼苗及移栽:从芽点切取长出两片叶子的部分(芽点尺寸应确保超过 3 cm,以保证具备足够的生长潜力),放入 M4 培养基中,之后将已经生根的小幼苗转移至蛭石中进行炼苗一周,再将小幼苗移栽至土壤中。

2.2.4. 转基因油菜的检测

待小花砵中的植株长出 2~3 片新叶,用 CTAB 法提取叶片 DNA,PCR 检测引物对位: pFGC5941-F (5'TGCCGATGAACCATGCATGTCGA3')和 G-Bna-C-R (5'CTGACATTAGGCACGTCAACCTGA3')。预计 PCR 产物的长度为 1497 bp,产物通过 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测结果。

2.2.5. 半定量 RT-PCR

用 RNA 试剂盒(普洛麦格,上海)分别提取转基因和野生型油菜幼苗叶片总 RNA,经反转录试剂盒 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoFisher Scientific, Shanghai)反转录合成 cDNA。根据 BnaHKL1 基因的保守区设计特异性引物 BnaHKL1-F (5'CGCGGATCCGCATTTAATTCTTGG3')和 BnaHKL1-R (5'ACTCCGTAGCTAACCTGAACGCTCA3'),同时,油菜看家基因 Actin2 作为参照,引物为 Actin2-F (5'TGCTAGACACCATGGAGCAGCGGCAGTGA3')和 Actin2-R (5'TGCTCAGCACCTAGGCGCACGTAA-GCA3')。以野生型与转基因植株的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,PCR 循环条件设置为:预变性 95℃,持续 3 分钟;变性 95℃,15 秒;退火 58℃,15 秒;延伸 72℃,45 秒;最终延伸 72℃,5 分钟,共进行 35 个循环。扩增产物经电泳后,通过凝胶成像系统拍照记录。所有实验重复进行三次。

2.2.6. 转基因植株的糖含量测定

用植物蔗糖含量检测试剂盒 BC2460 (索莱宝,北京)结合分光光度法测定油菜幼苗叶片蔗糖含量(用分光光度法测定),波长为 480 nm;用可溶性糖试剂盒 BC0030 (索莱宝,北京)结合分光光度法测定可溶性糖含量(用分光光度法测定),波长为 620 nm;用果聚糖试剂盒 FRUCTAN assay kit K-FRUC (Megazyme, Bray, Co. Wicklow, Ireland),结合分光光度法测定果聚糖含量(用分光光度法测定),波长为 410 nm;用淀粉试剂盒 BC0700 (索莱宝,北京)结合分光光度法测定淀粉含量(用分光光度法测定),波长为 620 nm。

3. 结果与分析

3.1. 植物表达载体 pFGC5941-BnaHKL1 的构建

以甘蓝型油菜 cDNA 为模板,采用引物 BnaHKL1-F 和引物 BnaHKL1-R 扩增 BnaHKL1 片段。结果表明,扩增产物大小与预期一致,约为 1497 bp (图 1)。将扩增得到的产物插入至 pFGC5941 的相应位点,并转化大肠杆菌。利用设计好的载体特异性引物 35S-F 和 Bna-C-R 对重组载体进行菌落 PCR 验证,结果

显示重组载体中的插入片段与预期一致(图 2)。经过测序分析，确认插入片段的序列及方向均正确，从而证明 pFGC5941-BnaHKL1 过量表达载体构建成功。

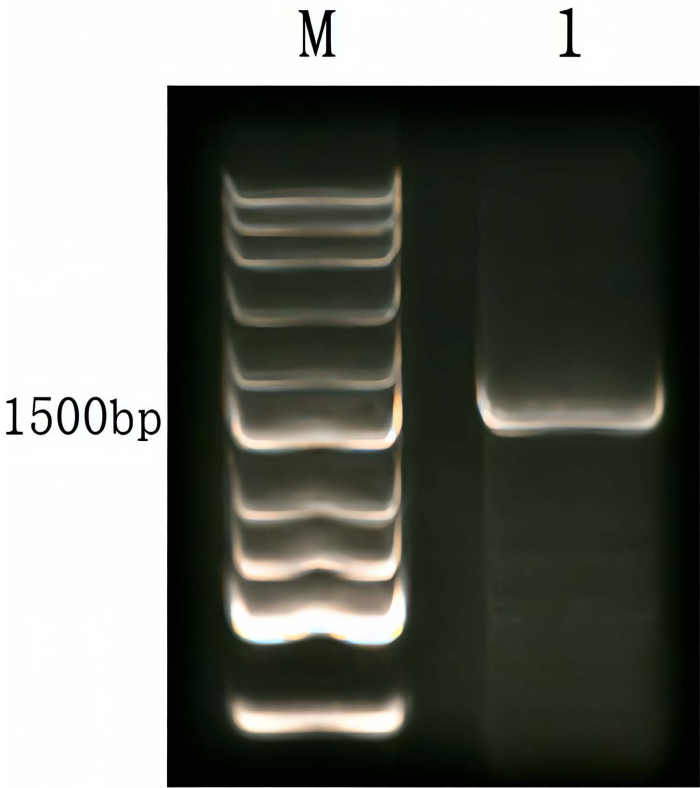


Figure 1. PCR amplification of BnaHKL1. M.250 bp DNA Ladder; 1. BnaHKL1
图 1. BnaHKL1 片段的 PCR 扩增结果。M.250 bp DNA Ladder; 1. BnaHKL1

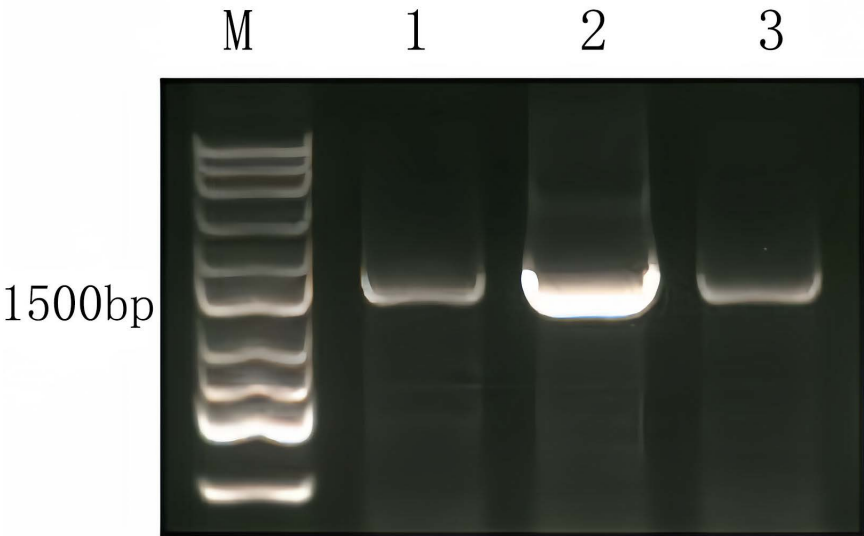


Figure 2. PCR amplification for detecting pFGC5941-BnaHKL1 vector. M.250 bp DNA Ladder; 1, 2, 3: BnaHKL1
图 2. pFGC5941-BnaHKL1 载体的菌落 PCR 鉴定。M.250 bp DNA Ladder; 1、2、3: BnaHKL1

3.2. 转基因植株的分子检测和过表达分析

借助农杆菌介导的甘蓝型油菜下胚轴遗传转化，420 个外植体，得到 34 株抗性油菜(图 3，表 1)。

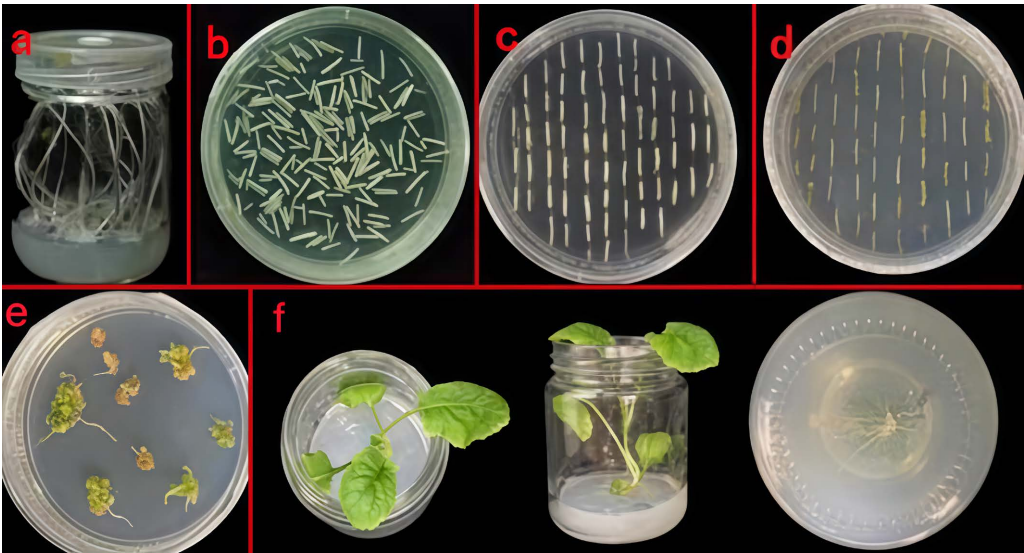


Figure 3. Genetic transformation of rapeseed mediated by agrobacterium tumefaciens. a) Hypocotyl growth; b) Joint culture; c) Callus induction; d) Callus differentiation; e) Roots formation; f) Regenerated plantlet
图 3. 根癌农杆菌介导的油菜遗传转化。a) 下胚轴生长; b) 共培养; c) 愈伤组织诱导; d) 愈伤组织分化; e) 生根; f) 再生植株

Table 1. Statistical table of transgenic rape
表 1. 转基因油菜统计表

载体	抗性	下胚轴	愈伤组织	抗性幼苗	转基因油菜	阳性率(%)
pFGC5941-BnaHKL1	PPT	420	112	34	11	32%

进一步对 34 株抗性苗进行 PCR 检测，确认获得了 11 株转基因植株(图 4)。

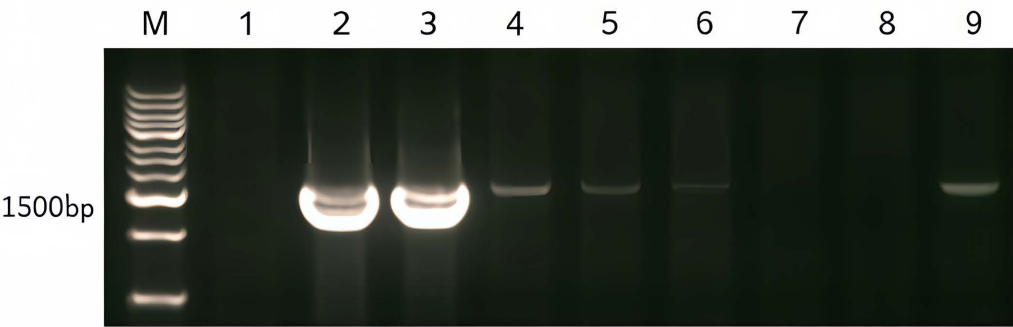


Figure 4. PCR detection of partial transgenic plants. M.1 kb DNA Ladder. 1~6: Transgenic plants; 7: Blank control; 8: Untransformed plant (negative control); 9: pFGC5941-BnaHKL1 vector (positive control)
图 4. 部分转基因植株的 PCR 检测。M.1 kb DNA Ladder. 1~6: 转基因植株; 7: 空白对照; 8: 未转基因植株 (阴性对照); 9: pFGC5941-BnaHKL1 载体(阳性对照)

从 11 株转基因植株中选取其在电泳检测中显示的电泳条带相对较弱的 3 株转基因植株，检测

BnaHKL1 基因是否过表达。半定量结果显示，相较于非转基因的野生型油菜，这三株转基因植物中 BnaHKL1 基因的表达量均显著提高(图 5)。

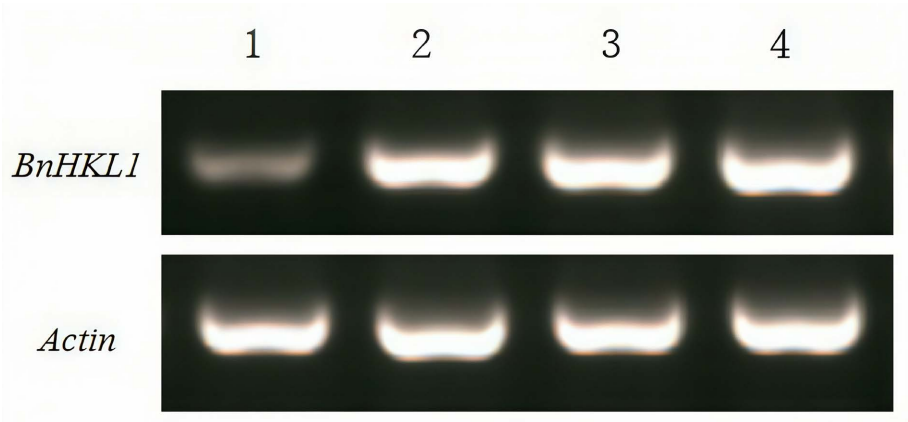
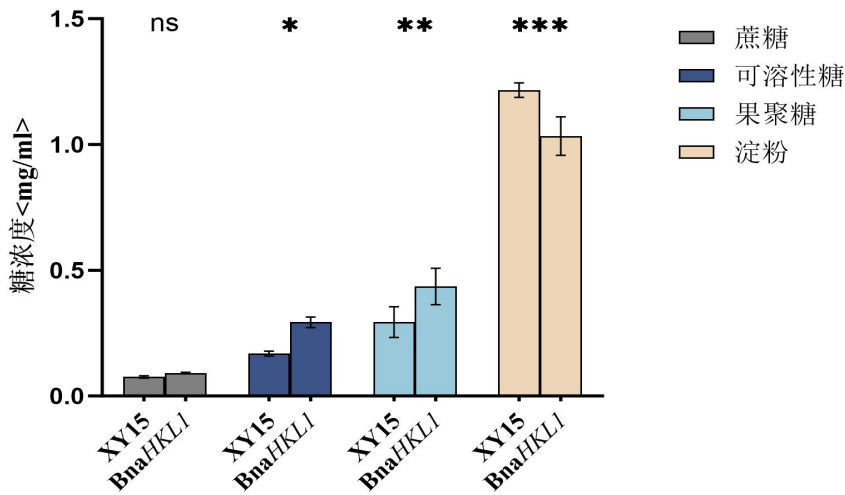


Figure 5. Expression analysis of the BnaHKL1 gene. 1. Wild-type; 2~4: Three transgenic plants of the to generation
图 5. BnaHKL1 基因表达分析。1.野生型植株；2~4: 3 株 To 代转基因植株

3.3. 糖含量测定分析

通过对受体 XY15 与过表达植株中的蔗糖、可溶性糖、果聚糖和淀粉进行了测定，结果显示：在过表达植株中的蔗糖、可溶性糖、果聚糖的含量显著高于 XY15 中的含量；相反，过表达植株中淀粉含量显著低于 XY15 植株中的含量(图 6)。



注：符号*表示在 p < 0.05 的概率水平上与 CK 有统计学意义上的显著偏差。

Figure 6. The variations in the sugar determination contents of XY15 and BnaHKL1
图 6. XY15 和 BnaHKL1 的糖测定含量变化

4. 讨论

己糖激酶存在于微生物、动物和植物中，是生物进化中最保守的葡萄糖传感器，是植物进行呼吸代谢的关键酶之一[23]。己糖激酶主要催化己糖磷酸化，使己糖进入糖酵解途径，为植物体的生长和发育提

供能量[24]。其中, 己糖激酶 HKL1 基因在植物体内具有多个同源基因, 参与植物糖代谢的基因, 编码的酶可以催化己糖的磷酸化, 从而参与植物体内糖的合成和分解代谢, 是植物生长发育和胁迫应答中发挥重要作用的基因[25]。

5. 结论

BnaHKL1 基因过量表达能改变油菜叶片中的糖的组分, 让蔗糖、果聚糖和总可溶性糖含量增加, 可溶性糖和果聚糖的增加有利于植物提高抗非生物胁迫的能力[26] [27]。

过量表达 BnaHKL1 基因来提高油菜组织中可溶性糖的含量, 就有可能创制出具有耐寒性的材料。油菜在“稻-稻-油”栽培模式下, 生产上急需特早熟油菜品种, 而特早熟油菜遇到的最主要的问题是: 在长江中下游以南, 1 月份气温往往在 $-1\sim-2^{\circ}\text{C}$, 这样的低温条件下, 幼荚难以形成果实, 后期无法形成有效产量。因此, 通过改变 HKL1 基因的表达模式, 不仅可以深入探究 HKL1 基因在植物耐寒过程中的作用机制, 还可能有利于创制幼荚耐寒的新种质, 为特早熟油菜品种的创制提供新的途径。

基金项目

国家自然科学基金委联合重点项目(U20A2028), 湖南农业大学研究生科研创新项目(2023XC078)。

参考文献

- [1] 殷艳, 王汉中. 我国油菜生产现状及发展趋势[J]. 农业展望, 2011, 7(1): 43-45.
- [2] 沈金雄, 傅廷栋. 我国油菜生产、改良与食用油供给安全[J]. 中国农业科技导报, 2011, 13(1): 1-8.
- [3] 王汉中. 以新需求为导向的油菜产业发展战略[J]. 中国油料作物学报, 2018, 40(5): 613-617.
- [4] 李积铭, 张耀文, 郭安强, 等. 油菜抗寒性和寒旱区油菜育种探析[J]. 华北农学报, 2023, 38(z1): 131-144.
- [5] 李方一, 黄璜, 官梅, 等. 油菜理想株型研究进展[J]. 中国油料作物学报, 2023, 45(1): 4-16.
- [6] 张哲, 殷艳, 刘芳, 等. 我国油菜多功能开发利用现状及发展对策[J]. 中国油料作物学报, 2018, 40(5): 618-623.
- [7] Raza, A. (2020) Eco-Physiological and Biochemical Responses of Rapeseed (*Brassica napus* L.) to Abiotic Stresses: Consequences and Mitigation Strategies. *Journal of Plant Growth Regulation*, **40**, 1368-1388. <https://doi.org/10.1007/s00344-020-10231-z>
- [8] Liu, X., Wei, R., Tian, M., Liu, J., Ruan, Y., Sun, C., et al. (2022) Combined Transcriptome and Metabolome Profiling Provide Insights into Cold Responses in Rapeseed (*Brassica napus* L.) Genotypes with Contrasting Cold-Stress Sensitivity. *International Journal of Molecular Sciences*, **23**, Article 13546. <https://doi.org/10.3390/ijms232113546>
- [9] 孙永梅, 刘丽杰, 冯明芳, 等. 植物在低温胁迫下的糖代谢研究进展[J]. 东北农业大学学报, 2015, 46(7): 95-102, 108.
- [10] Ke, L., Lei, W., Yang, W., Wang, J., Gao, J., Cheng, J., et al. (2020) Genome-Wide Identification of Cold Responsive Transcription Factors in *Brassica napus* L. *BMC Plant Biology*, **20**, Article No. 62. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-2253-5>
- [11] Ma, L., Coulter, J.A., Liu, L., Zhao, Y., Chang, Y., Pu, Y., et al. (2019) Transcriptome Analysis Reveals Key Cold-Stress-Responsive Genes in Winter Rapeseed (*Brassica rapa* L.). *International Journal of Molecular Sciences*, **20**, Article 1071. <https://doi.org/10.3390/ijms20051071>
- [12] 范军强, 路晓明, 王会文, 等. 低温胁迫下甘蓝型冬油菜抗寒性与叶片激素含量的关联性[J]. 江苏农业学报, 2023, 39(1): 15-21.
- [13] 贾朋贺, 刘红, 杨定国, 等. 植物多糖的提取、修饰及其糖代谢作用[J]. 食品研究与开发, 2022, 43(5): 210-216.
- [14] 叶香媛, 周文彬. 植物果糖激酶研究进展[J]. 科学通报, 2021, 66(22): 2820-2831.
- [15] 俞鏊, 李志邈, 万红建, 等. 高等植物蔗糖转化酶功能的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2013, 41(33): 12815-12818, 12822.
- [16] Moore, B., Zhou, L., Rolland, F., Hall, Q., Cheng, W., Liu, Y., et al. (2003) Role of the *Arabidopsis* Glucose Sensor HXK1 in Nutrient, Light, and Hormonal Signaling. *Science*, **300**, 332-336. <https://doi.org/10.1126/science.1080585>

- [17] 张超, 王彦杰, 付建新, 等. 高等植物己糖激酶基因研究进展[J]. 生物技术通报, 2012(4): 19-26.
- [18] 张超, 付三雄, 周小婴, 等. 甘蓝型油菜 GPDH 基因克隆、表达分析及植物过表达载体构建[J]. 南方农业学报, 2019, 50(7): 1399-1407.
- [19] 郑本川, 李浩杰, 张锦芳, 等. 甘蓝型油菜 CONSTANS 基因植物过表达载体构建及转基因植株的获得[J]. 分子植物育种, 2018, 16(1): 130-134.
- [20] 陈吉杨, 阮颖, 刘博宇. 甘蓝型油菜含 MATH 结构域基因 BnaM154 过表达载体的构建与转化[J]. 分子植物育种, 2022, 20(13): 4377-4382.
- [21] Zheng, B., Li, H., Zhang, J., Cui, C., Chai, L., Jiang, J., *et al.* (2018) Construction of Overexpression Vector of CONSTANS Gene Plant in *Brassica napus* and Production of Transgenic Plants. *Molecular Plant Breeding*, **9**, 73-79. <https://doi.org/10.5376/mpb.2018.09.0010>
- [22] 马骊, 白静, 赵玉红, 等. 冷胁迫下甘蓝型冬油菜表达蛋白及 BnGSTs 基因家族的鉴定与分析[J]. 作物学报, 2023, 49(1): 153-169.
- [23] 呼芳娣, 刘丽君, 马骊, 等. 低温胁迫下甘蓝型冬油菜 BnYUCCA8 基因差异表达及内源生长素含量变化[J]. 干旱地区农业研究, 2022, 40(3): 1-10.
- [24] Janeczko, A., Gullner, G., Skoczowski, A., Dubert, F. and Barna, B. (2007) Effects of Brassinosteroid Infiltration Prior to Cold Treatment on Ion Leakage and Pigment Contents in Rape Leaves. *Biologia Plantarum*, **51**, 355-358. <https://doi.org/10.1007/s10535-007-0072-2>
- [25] Wilson, J.E. (2003) Isozymes of Mammalian Hexokinase: Structure, Subcellular Localization and Metabolic Function. *Journal of Experimental Biology*, **206**, 2049-2057. <https://doi.org/10.1242/jeb.00241>
- [26] Sun, X., Zong, Y., Yang, S., Wang, L., Gao, J., Wang, Y., *et al.* (2020) A Fructan: The Fructan 1-Fructosyl-Transferase Gene from *Helianthus tuberosus* Increased the PEG-Simulated Drought Stress Tolerance of Tobacco. *Hereditas*, **157**, Article No. 14. <https://doi.org/10.1186/s41065-020-00131-3>
- [27] Ozturk, M., Turkyilmaz Unal, B., García-Caparrós, P., Khursheed, A., Gul, A. and Hasanuzzaman, M. (2020) Osmoregulation and Its Actions during the Drought Stress in Plants. *Physiologia Plantarum*, **172**, 1321-1335. <https://doi.org/10.1111/ppl.13297>