

## 5 - 氮杂胞苷对白菜幼苗 DNA 甲基化和耐热性的影响

许会会, 刘维信\*, 孙 艳, 林 多

(青岛农业大学园林园艺学院, 山东青岛 266109)

**摘 要:** 研究了不同浓度 5 - 氮杂胞苷 (5-azaC) 处理白菜 ‘夏帝’ 和 ‘冬赏味’ 品种的种子, 对其幼苗甲基化和耐热性的影响。结果表明: 不同浓度 5-azaC 溶液处理可显著降低幼苗 DNA 甲基化水平, 植株形态发育未见异常。0.1 ~ 0.2 mol · L<sup>-1</sup> 5-azaC 处理可减缓幼苗在高温胁迫下的生长量、POD 活性和蛋白质含量的降低幅度, 同时降低 MDA 含量和细胞膜透性。

**关键词:** 白菜; 5 - 氮杂胞苷; 甲基化; 高温胁迫; 耐热性

**中图分类号:** S 634.3

**文献标识码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2012) 03-0567-07

## The Effects of 5-azacytidine on DNA Methylation and Heat Tolerance of Seedlings of Non-heading Chinese Cabbage

XU Hui-hui, LIU Wei-xin\*, SUN Yan, and LIN Duo

(College of Landscaping & Horticulture, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109, China)

**Abstract:** The effects of 5-azacytidine (5-azaC) on DNA methylation levels and heat tolerance of two commercial cultivars of non-heading Chinese cabbage [*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* (L.) Makino], e.i. ‘Xiadi’ and ‘Dongshangwei’, were studied. The results showed that DNA methylation levels of seedlings of the two cultivars were significantly decreased, no abnormal growth or development was observed. Pre-treatment of seeds of non-heading Chinese cabbage with 0.1 - 0.2 mol · L<sup>-1</sup> of 5-azaC would slow down the decreasing of growth, POD activity, and soluble protein content of seedlings under heat stress, and decrease MDA content and cell membrane permeability as well.

**Key words:** non-heading Chinese cabbage; 5-azaC; DNA methylation; heat stress; heat tolerance

白菜 [*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* (L.) Makino] 又名青菜、油菜等, 在中国广泛栽培 (侯喜林 等, 2000)。但由于大多数白菜品种的耐热性较差, 白菜供应存在夏淡季问题。

过去 20 多年来, 人们从白菜形态学和生理生化及遗传等多方面对其耐热性进行了研究, 以期制定出相应的栽培技术措施和培育耐热新品种。以往白菜耐热性鉴定常采用综合指标评价 (刘维信和曹寿椿, 1993; 刘燕燕 等, 2005), 并认为热伤害与细胞膜的过氧化有关 (刘维信和曹寿椿, 1992;

**收稿日期:** 2011 - 12 - 19; **修回日期:** 2012 - 02 - 24

**基金项目:** ‘十一五’ 国家科技支撑计划项目 (2008BADB1B01); 山东省自然科学基金项目 (Y2007D26)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: liuweixin2006@163.com)

叶凡等, 2007; 陈以博等, 2010)。

近来研究发现 DNA 去甲基化可能与植物逆境伤害过程中的过氧化有关(赵云雷等, 2009)。5-氮杂胞苷(5-azaC)是一种去甲基化试剂, 可导致植物异常发育(赵云雷等, 2009)并能促进拟南芥和白菜开花(李梅兰等, 2002)。

本研究的目的在于探讨 5-azaC 处理对白菜耐热性的影响, 为弄清其耐热机理及耐热性的调控提供参考资料。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料及其处理

白菜品种‘冬赏味’和‘夏帝’种子分别购自广东良种引进开发公司和福州夏播王种子公司。5-azaC 药剂购自 Sigma 公司。试验于 2009 年秋季和 2011 年春季在青岛农业大学温室中进行。

2010 年 10 月 7 日, 将白菜种子先在温水浸泡 1 h 后再用 70%乙醇浸 90 s, 最后用无菌水洗 4~5 次。消毒后的种子放于铺有用 5-azaC 液体浸湿滤纸的培养皿内, 在生化培养箱(20 °C)中催芽。5-azaC 溶液的浓度分别为 0、0.05、0.10 和 0.20 mol·L<sup>-1</sup>。每天用新浸湿的滤纸将旧的更换掉, 共处理 5 d。2010 年 10 月 12 日将处理后的子叶期幼苗用清水冲洗后移栽于穴盘中, 正常管理。

选取生长一致的 30 d 苗龄幼苗移入 LRH-400-GSZ 智能型人工培养箱中进行高温处理, 高温胁迫温度(日/夜)为 36/28 °C, 光照为 12 h·d<sup>-1</sup>, 对照温度(日/夜)为 20/12 °C。

### 1.2 生长指标与生理指标测定

高温处理前观察和测定白菜株高、开展度、叶长和叶宽等形态指标。高温处理 7 d 后测定幼苗的鲜质量和干质量, 然后分别减去相应初始值得到各自绝对增长量。以 20/12 °C 的绝对增长量为对照, 计算相对增长量(高温下绝对增长量/对照温度下绝对增长量 × 100)。

高温胁迫处理 48 h 后测定耐热性相关生理指标。质膜透性采用电导仪测定, 以电解质外渗率表示。MDA 含量用硫代巴比妥酸法测定。可溶性蛋白质含量采用考马斯亮蓝 G-250 染色法测定。SOD 活性采用 NBT 光还原法测定。POD 活性采用分光光度法测定。

### 1.3 DNA 的提取与甲基化水平测定

不同浓度 5-azaC 处理后, 分别取带胚轴子叶和播种 30 d 后的幼嫩叶片提取 DNA。称取 0.2 g 试验材料, 加入液氮充分研磨后移至 2 mL 离心管中, 加入 600 μL 预热(65 °C)的提取液(1 mol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl pH 8.0, 0.5 mol·L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>EDTA, 5 mol·L<sup>-1</sup> NaCl, 20% SDS, 3.8 g·L<sup>-1</sup> Na Bisufite)混匀, 65 °C 水浴 60 min, 期间上下颠倒混匀几次; 冷却至室温加入 600 μL 酚-氯仿-异戊醇(25:24:1)摇匀至充分乳化, 12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min, 取上清液转移至新离心管中; 加入等体积的氯仿-异戊醇(24:1)混匀, 12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min, 取上清液, 转移至新离心管中; 加入 3 μL RNase (10 mg·mL<sup>-1</sup>), 室温处理 1.0 h。

在 100 μL 大约含 DNA 30 μg DNA 溶液中加入 10 μL 3 mol·L<sup>-1</sup> NaAc (pH 5.2), 再加入 200 μL 冰冷的无水乙醇, 在 -20 °C 放置 1 h, DNA 沉淀后 12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min, 在室温下自然风干。

在风干的 DNA 中加入 70%的高氯酸 50 μL, 在沸水浴中水解 1 h, 然后用 KOH (1 mol·L<sup>-1</sup>) 调整至 pH 3~5, 形成 KClO<sub>4</sub> 沉淀后 12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min。

取上清液于室温下通过进样器加到 Aglient 1100 型液相色谱仪的 Aglient XDB C18 柱。柱温为 30 °C, 流动相由 100%的甲醇和 50 mmol·L<sup>-1</sup> 的磷酸二氢钾 (pH 5.9) 组成, 流速为 0.80 mL·min<sup>-1</sup>,

进样量为 40.0  $\mu\text{L}$ 。用购自 SIGMA 公司的胞嘧啶 (C) 和 Alfa Aesar 公司的 5-甲基胞嘧啶 ( $^5\text{mC}$ ) 标样作对照, 所用检测器为紫外检测器, 检测波长为 273 nm。通过计算  $^5\text{mC}$  的峰值面积/( $^5\text{mC}$  的峰面积 + C 的峰面积) 的百分比, 检测 DNA 总甲基化水平。

## 2 结果与分析

### 2.1 5-azaC 处理对白菜 DNA 甲基化水平的影响

5-azaC 溶液处理 5 d 后两个品种子叶期幼苗 DNA 甲基化水平均分别较对照显著下降, 并以 0.10  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  浓度时降低最明显 (图 1, A)。

30 d 后两个品种幼苗的 DNA 甲基化水平有所升高, 0.05  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  5-azaC 处理与其各自对照无显著差异; ‘夏帝’ 0.1 和 0.2  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  5-azaC 处理仍显著低于对照, ‘冬赏味’ 0.1  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  5-azaC 处理显著低于对照 (图 1, B)。

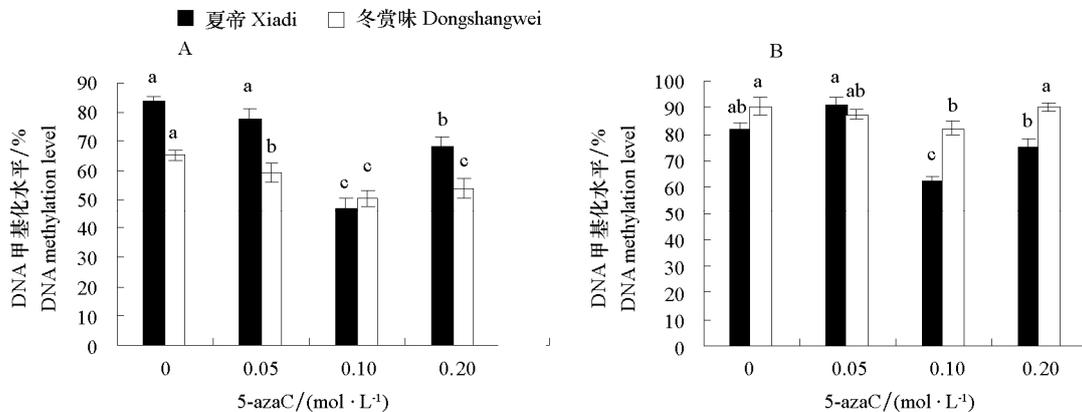


图 1 不同浓度 5-azaC 处理对 5 d 子叶期 (A) 和 30 d 幼苗期 (B) 白菜 DNA 甲基化水平的影响

Fig. 1 Effects of different concentrations of 5-azaC on DNA methylation levels of two cultivars of non-heading Chinese cabbage at the cotyledon stage (A, 5 d after germination) and seedling stage (B, 30 d after germination)

### 2.2 5-azaC 处理对白菜幼苗生长发育的影响

如表 1 所示, ‘夏帝’ 和 ‘冬赏味’ 白菜种子经不同浓度 5-azaC 处理, 30 d 龄幼苗的株高、开展度、叶片长度和宽度与对照无显著差异, 植株未见形态发育异常。

表 1 不同浓度 5-azaC 处理对白菜形态指标的影响

Table 1 The effects of different concentrations of 5-azaC on morphological traits of two cultivars of non-heading Chinese cabbage

品种 Cultivar	5-azaC/ ( $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	株高/cm Plant height	开展度/cm Plant width	叶长/cm Leaf length	叶宽/cm Leaf width
夏帝 Xiadi	0	6.22 ± 0.12 a	6.98 ± 0.38 a	5.07 ± 0.36 a	1.52 ± 0.11 a
	0.05	6.58 ± 0.19 a	7.28 ± 0.26 a	5.36 ± 0.33 a	1.80 ± 0.11 a
	0.10	6.50 ± 0.31 a	7.58 ± 0.65 a	4.69 ± 0.44 a	1.76 ± 0.07 a
	0.20	5.16 ± 0.36 a	6.70 ± 0.32 a	4.61 ± 0.30 a	1.71 ± 0.08 a
冬赏味 Dongshangwei	0	7.90 ± 0.35 a	8.30 ± 0.61 a	7.45 ± 0.24 a	2.36 ± 0.10 a
	0.05	7.43 ± 0.36 a	9.60 ± 0.82 a	6.84 ± 0.26 a	2.04 ± 0.09 a
	0.10	7.18 ± 0.42 a	10.54 ± 0.56 a	6.68 ± 0.56 a	2.16 ± 0.09 a
	0.20	8.43 ± 0.32 a	9.70 ± 0.72 a	7.88 ± 0.34 a	2.41 ± 0.07 a

注: 同一列中同一品种不同字母表示在  $P < 0.05$  水平下差异显著; 表中数值为 5 个植株的平均值 ± 标准误。

Note: Different letters in the same column indicate significant difference at the  $P < 0.05$  level; Values were average ± SE of 5 plants.

### 2.3 5-azaC 处理对高温胁迫下白菜生长与生理指标的影响

#### 2.3.1 相对生长量与细胞膜透性

以正常温度下对照植株的绝对生长量为 100 计算发现, 未经 5-azaC 处理的两个品种幼苗的干质量和鲜质量在高温胁迫下的相对生长量仅为 14.08 ~ 19.76 (表 2)。

0.1 mol · L<sup>-1</sup> 5-azaC 处理可显著增加高温下幼苗的相对生长量, 而其他两个浓度的 5-azaC 溶液处理的与未处理对照无显著差异。

不同浓度 5-azaC 处理使高温胁迫下两个品种幼苗细胞膜透性低于对照, 且随处理浓度增加而降低, 其中 0.2 mol · L<sup>-1</sup> 5-azaC 处理的细胞膜透性显著低于对照 (表 2), 表明 5-azaC 处理具有减缓高温胁迫对白菜细胞膜损伤的作用。

表 2 不同浓度 5-azaC 处理对高温胁迫下两个白菜品种相对生长量和细胞膜透性的影响

Table 2 The effects of different concentrations of 5-azaC on relative growth and cell membrane permeability of two cultivars of non-heading Chinese cabbage under high temperature

5-azaC/ (mol · L <sup>-1</sup> )	鲜质量/ %		干质量/ %		细胞膜透性/ %	
	Fresh weight		Dry weight		Cell membrane permeability	
	夏帝 Xiadi	冬赏味 Dongshangwei	夏帝 Xiadi	冬赏味 Dongshangwei	夏帝 Xiadi	冬赏味 Dongshangwei
0	19.76 b	14.08 b	19.64 b	15.18 b	26.41 a	22.86 ab
0.05	22.13 b	21.84 ab	18.72 b	16.62 b	19.51 bc	23.25 a
0.10	44.82 a	34.71 a	39.38 a	40.95 a	21.28 b	20.99 b
0.20	14.48 b	16.49 b	27.97 ab	16.92 b	17.54 c	18.75 c

注: 同一列中不同字母表示在  $P < 0.05$  水平下差异显著。

Note: Different letters in the same column indicate significant difference at the  $P < 0.05$  level.

#### 2.3.2 MDA 含量

由图 2 可以看出, 在 20/12 °C 对照温度下, 两个品种不同 5-azaC 处理间 MDA 含量无显著差异。而在高温胁迫下 MDA 含量均较常温对照有增高趋势, 且 5-azaC 处理多数较无 5-azaC 处理的对照显著降低, 表明适当浓度的 5-azaC 能够降低高温胁迫下白菜膜脂过氧化作用。

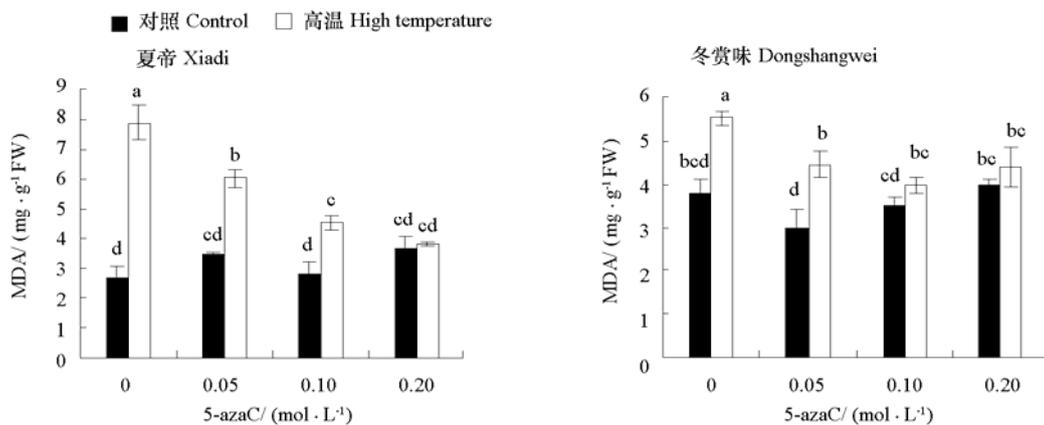


图 2 高温胁迫下不同 5-azaC 浓度处理对两个白菜品种 MDA 含量的影响

Fig. 2 MDA contents of two cultivars of non-heading Chinese cabbage treated with different concentrations of 5-azaC under high temperature

### 2.3.3 SOD 和 POD 活性

由图 3 可见, 两个品种的 SOD 相对活性在高温处理下均显著高于常温对照, 同一品种不同浓度 5-azaC 处理间无显著差异。

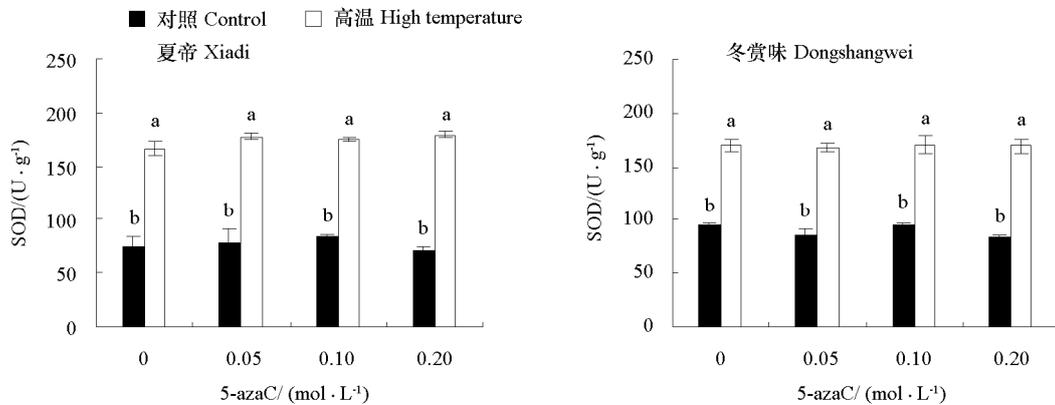


图 3 不同浓度 5-azaC 处理对高温胁迫下两个白菜品种 SOD 活性的影响

Fig. 3 Effects of different concentrations of 5-azaC on SOD activities of two cultivars of non-heading Chinese cabbages under high temperature

5-azaC 处理对高温胁迫下白菜幼苗 POD 活性的影响见图 4。无论是在常温对照还是高温处理条件下, 同一品种不同 5-azaC 处理间差异不显著。与常温条件下相比, 除 0.1 mol·L<sup>-1</sup> 浓度 5-azaC 处理外, 两个品种高温下叶片 POD 相对活性均显著低于各自的常温对照, 表明 0.1 mol·L<sup>-1</sup> 浓度 5-azaC 处理能够提高高温下 POD 酶活性。

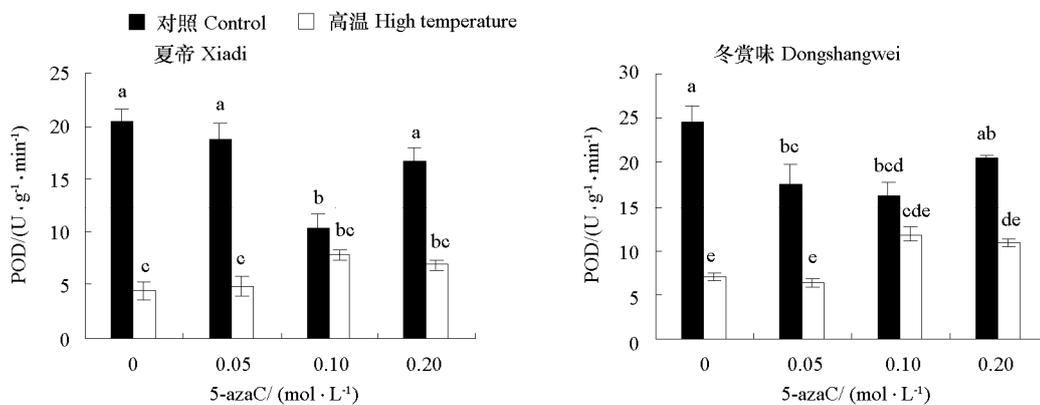


图 4 不同浓度 5-azaC 处理对高温胁迫下两个白菜品种 POD 活性的影响

Fig. 4 Effects of different concentrations of 5-azaC on POD activities of two cultivars of non-heading Chinese cabbage under high temperature

### 2.3.4 可溶性蛋白含量

与各自的常温对照相比, 高温胁迫下两个品种的可溶性蛋白质含量均显著降低。随着 5-azaC 处理浓度的提高, ‘冬赏味’ 品种的可溶性蛋白含量增加 (图 5), 表明较高浓度的 5-azaC 处理对高温胁迫下白菜可溶性蛋白含量有一定的提高作用。

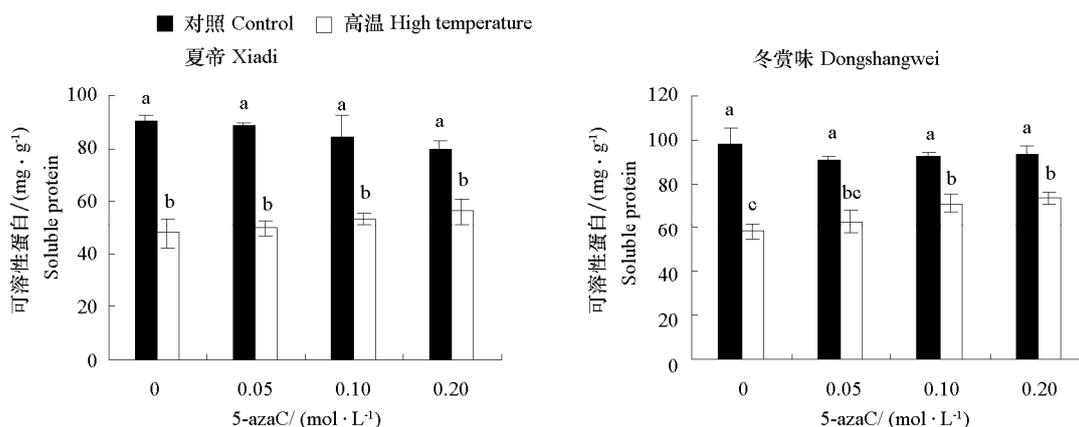


图5 不同浓度 5-azaC 处理对高温胁迫下两个白菜品种可溶性蛋白含量的影响  
Fig. 5 Effects of 5-azaC concentration on soluble protein contents of two cultivars of non-heading Chinese cabbage under high temperature

### 3 讨论

DNA 甲基化是指 DNA 复制后, 在 DNA 甲基转移酶的作用下将 S-腺苷酰甲硫氨酸 (SAM) 分子上的甲基转移到 DNA 分子中胞嘧啶残基的 5 位碳原子上。DNA 甲基化参与环境胁迫下基因的表达调控过程, 在生长发育过程中起着重要的作用 (Bastow et al., 2004; 赵云雷 等, 2009)。5-azaC 作为一种去甲基化试剂, 处理植物后可能激活了一系列与生长和耐逆境有关的基因。

本试验结果表明, 不同浓度 5-azaC 溶液处理白菜种子可降低幼苗 DNA 甲基化水平, 且 0.1 mol·L<sup>-1</sup> 5-azaC 处理的效果在 30 d 后还能检测到, 这与李梅兰等 (2002) 在大白菜上的结果一致。有报道 DNA 去甲基化可导致植物异常发育 (Finnegan et al., 1996)。本试验中不同浓度 5-azaC 处理后两个白菜品种未见明显发育异常 (表 1)。前人报道多关注 5-azaC 对白菜 (李梅兰 等, 2002; 2003)、萝卜 (汪炳良 等, 2005) 和青花菜 (于锡宏 等, 2008) 春化和开花的影响, 未见对植株发育异常的报告。

本试验中观察到高温下白菜过氧化作用导致 MDA 含量增加和细胞膜伤害, 这与前人报道结果 (刘维信和曹寿椿, 1992; 叶凡 等, 2007; 陈以博 等, 2010) 一致。本研究中结果表明 5-azaC 处理能在一定程度上降低高温胁迫下白菜 MDA 的积累, 抑制了膜脂过氧化作用, 同时使高温下细胞伤害率降低, 相对生长量增加, 增强了耐热性。有报道 DNA 甲基化参与了逆境胁迫下基因的表达调控, 而 DNA 去甲基化可能与植物逆境伤害过程中的过氧化有关 (赵云雷 等, 2009)。已有研究表明, 在 DNA 水平上活性氧 (ROS) 攻击导致主要化合物 8-羟基鸟苷的形成, 生物体通过 DNA 糖基化酶催化的切除修复机制可以修复这种氧化损伤 (Christmann et al., 2003)。赵云雷等 (2009) 推测, 植物在受到伤害后可通过 5-甲基胞嘧啶激活 DNA 修复系统。SOD 和 POD 作为细胞抵御活性氧伤害的重要保护酶在清除自由基和抗自由基伤害方面起到重要作用。本研究结果表明, 高温胁迫下 5-azaC 处理的白菜 SOD 活性较无处理对照高。高温胁迫下两个白菜品种的 POD 活性均有所下降, 但 0.2 mol·L<sup>-1</sup> 5-azaC 处理减缓了下降趋势。在高温胁迫下白菜幼苗叶片可溶性蛋白质含量下降, 而 5-azaC 处理可使下降程度减缓。由此推测, 适当浓度的 5-azaC 处理有可能通过保护高温胁迫下 SOD 和 POD 酶活性, 进而降低膜脂过氧化程度, 以提高白菜耐热性, 而膜脂过氧化作用是复杂的耐热调控机制之一 (Kotak et al., 2007)。

## References

- Bastow R, Mylne J S, Lister C, Lippman Z, Martienssen R A, Dean C. 2004. Vernalization requires epigenetic silencing of FLC by histone methylation. *Nature*, 427: 164 - 167.
- Chen Yi-bo, Hou Xi-lin, Chen Xiao-feng. 2010. Studies on heat tolerance mechanism of non-heading Chinese cabbage. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 33 (1): 27 - 31. (in Chinese)
- 陈以博, 侯喜林, 陈晓峰. 2010. 白菜幼苗耐热性机制初步研究. *南京农业大学学报*, 33 (1): 27 - 31.
- Christmann M, Tomicic-Christmann M, Roos W P, Kaina B. 2003. Mechanisms of human DNA repair: An update. *Toxicology*, 193: 3 - 34.
- Finnegan E J, Peacock W J, Dennis E S. 1996. Reduced DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* results in abnormal plant development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93: 8449 - 8454.
- Hou Xi-lin, Cao Shou-chun, She Jian-ming, Cai Xiao-ning, Lu Wei-zhong. 2000. Plantlet regeneration from cotyledon protoplast culture of non-heading Chinese cabbage. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 23 (4): 17 - 20. (in Chinese)
- 侯喜林, 曹寿椿, 余建明, 蔡小宁, 陆维忠. 2000. 白菜子叶原生质体培养再生植株. *南京农业大学学报*, 23 (4): 17 - 20.
- Kotak S, Larkindale J, Lee U, von Koskull-Doring P, Scharf K D. 2007. Complexity of the heat stress response in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 10: 310 - 316.
- Li Mei-lan, Zeng Guang-wen, Zhu Zhu-jun. 2002. Effects of 5-azacytidine (5-azaC) and gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) on flowering of *Brassica campestris* ssp. *chinensis* L. *Journal of Shanghai Jiao Tong University: Agricultural Science*, 20 (2): 125 - 128. (in Chinese)
- 李梅兰, 曾广文, 朱祝军. 2002. 5-氮杂胞苷 (5-azaC) 和赤霉素 (GA<sub>3</sub>) 对白菜开花的影响. *上海交通大学学报: 农业科学版*, 20 (2): 125 - 128.
- Li Mei-lan, Zeng Guang-wen, Zhu Zhu-jun. 2003. Analysis of effects of 5-azacytidine on promoting flowering in non-heading Chinese cabbage. *Journal of Zhejiang University: Agriculture & Life Science*, 29 (3): 287 - 290. (in Chinese)
- 李梅兰, 曾广文, 朱祝军. 2003. 5-氮杂胞苷促进白菜开花的效应分析. *浙江大学学报: 农业与生命科学版*, 29 (3): 287 - 290.
- Liu Wei-xin, Cao Shou-chun. 1992. Influences of high temperature on cell membrane permeability, peroxidase activity and other biochemical indices in non-heading Chinese cabbage. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 15 (3): 115 - 117. (in Chinese)
- 刘维信, 曹寿椿. 1992. 高温对白菜细胞膜透性、过氧化物酶活性及其他生化性状的影响. *南京农业大学学报*, 15 (3): 115 - 117.
- Liu Wei-xin, Cao Shou-chun. 1993. A study on evaluation and related characteristics of non-heading Chinese cabbage under summer high temperature. *Journal of Shandong Agricultural University*, 24 (2): 176 - 181. (in Chinese)
- 刘维信, 曹寿椿. 1993. 夏季高温条件下白菜品种评价及相关性状研究. *山东农业大学学报*, 24 (2): 176 - 181.
- Liu Yan-yan, Shen Huo-lin, Liu Yi-qian. 2005. A study on the relationship between the growth and physiology of Pakchoi and heat tolerance. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 20 (5): 25 - 29. (in Chinese)
- 刘燕燕, 沈火林, 刘以前. 2005. 高温胁迫对白菜幼苗生长及生理指标的影响. *华北农学报*, 20 (5): 25 - 29.
- Wang Bing-liang, Li Shui-feng, Zeng Guang-wen, Deng Jian-ying. 2005. Effect of 5-azacytosine on flowering and DNA methylation level of stem apices in radish (*Raphanus sativus* L.). *Acta Agriculturae Nucleatae Sinica*, 19 (4): 265 - 268. (in Chinese)
- 汪炳良, 李水凤, 曾广文, 邓剑英. 2005. 5-azaC 对萝卜茎尖 DNA 甲基化和开花的影响. *核农学报*, 19 (4): 265 - 268.
- Ye Fan, Hou Xi-lin, Yuan Jian-yu. 2007. Effects of heat stress on antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation of non-heading Chinese cabbage seedlings. *Jiangsu Journal of Agricultural Science*, 23 (2): 154 - 156. (in Chinese)
- 叶凡, 侯喜林, 袁建玉. 2007. 高温胁迫对白菜幼苗抗氧化酶活性和膜脂过氧化作用的影响. *江苏农业学报*, 23 (2): 154 - 156.
- Yu Xi-hong, Li Dan, Jiang Xin-mei. 2008. The effect of DNA demethylation on vernalization in broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica* Plenck). *China Vegetables*, (10): 16 - 18. (in Chinese)
- 于锡宏, 李丹, 蒋欣梅. 2008. DNA 去甲基化试剂处理对青花菜春化作用的影响. *中国蔬菜*, (10): 16 - 18.
- Zhao Yun-lei, Ye Wu-wei, Wang Jun-juan, Fan Bao-xiang, Song Li-yan. 2009. Review of DNA methylation and plant stress-tolerance. *Acta Botanical Boreal-Occident Sinica*, 29 (7): 1479 - 1489. (in Chinese)
- 赵云雷, 叶武威, 王俊娟, 樊保香, 宋丽艳. 2009. DNA 甲基化与植物抗逆性研究进展. *西北植物学报*, 29 (7): 1479 - 1489.