桃*PpNST1*和*PpSND1*转录因子基因的克隆与表达分析

胡昊[1,2], 刘勇[1], 刘悦萍[2], 邬瑞杰[2], 花宝光[2,*], 王有年[2,*]
[1]北京林业大学林学院, 北京100083; [2]北京农学院, 农业部都市农业(北方)重点实验室, 北京102206

摘要: 为了解NAC类转录因子与桃果实内果皮发育木质化的关系, 本文以桃内果皮为试材, 采用同源基因克隆法获得了两个NAC类转录因子的全长编码区, 分别命名为*PpNST1*和*PpSND1*。序列分析表明2个基因编码区全长均为1 188 bp, 可编码396个氨基酸, 其预测蛋白均包含1个NAC结构域和2个特征结构域(LP-box和WQ-box)。氨基酸序列系统进化分析显示PpNST1和PpSND1与苹果、葡萄、毛果杨和拟南芥等参与调控次生细胞壁形成和木质化的NST/SND1类转录因子具有较高同源性。荧光实时定量PCR分析表明, *PpNST1*和*PpSND1*的表达水平随内果皮的木质化程度加强而不断升高, 分别于盛花期后59和52 d达到最高表达量, 且它们在内果皮中的表达水平远高于中果皮。对PpNST1和PpSND1下游可能的作用靶标进行进一步的表达分析表明, PpNST1和PpSND1可能在内果皮发育木质化过程中扮演重要角色。

关键词: 桃; 内果皮; 发育木质化; NAC转录因子

Cloning and Expression Analysis of *PpNST1* and *PpSND1* Genes from *Prunus persica* L.

HU Hao[1,2], LIU Yong[1], LIU Yue-Ping[2], WU Rui-Jie[2], HUA Bao-Guang[2,*], WANG You-Nian[2,*]
[1]College of Forestry, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; [2]Key Laboratory of Urban Agriculture (North), Ministry of Agriculture, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China

Abstract: In order to investigate the relationship between NAC domain transcription factors and developmental lignification of peach endocarp, two NAC domain transcription factor genes *PpNST1* and *PpSND1* were isolated from peach (*Prunus persica* L. 'Okubo') endocarp by homologous cloning. Sequence analysis indicated that both *PpNST1* and *PpSND1* were 1 188 bp, encoding 396 amino acids. The predicted proteins of them contained one NAC domain in N terminus and two featured domains (LP-box and WQ-box) in C terminus. Phylogenetic analysis results revealed that PpNST1 and PpSND1 were closely related to secondary cell wall formation- and lignification-related NAC domain transcription factors in *Malus domestica*, *Vitis vinifera*, *Populus trichocarpa* and *Arabidopsis thaliana*. Quantitative real-time PCR analysis showed that the expression patterns of *PpNST1* and *PpSND1* were dramatically up-regulated during the lignification of peach endocarp, and their transcript expression levels were more abundant in endocarp than in mesocarp. Moreover, the expression analysis of the putative downstream targets of PpNST1 and PpSND1 suggested that they might play important role in endocarp developmental lignification.

Key words: *Prunus persica*; endocarp; developmental lignification; NAC domain transcription factor

内果皮发育木质化是蔷薇科等植物果实发育过程中的一种特殊现象(Dardick等2010)。其形成过程与植物中普遍存在的管状分子(tracheary element)的形成过程类似, 以木质素在次生细胞壁中沉积为起始, 继而引发细胞凋亡, 并最终形成高度木质化的死细胞, 而这一过程的核心环节就是木质素等次生代谢物的沉积(Marjamaa等2007)。木质素不仅可以为植物提供机械支持、水分运输和防御保护等重要功能，而且也在造纸、饲料、化工和生物质能源等经济领域中占有重要地位(Boerjan等2003)。虽然目前有关木质素的生物合成途径的研究已经较为深入, 但是越来越多的证

收稿 2012-03-13 修定 2012-04-27
资助 国家自然科学基金项目(30872029)、北京市自然科学基金重点项目(6071001)、北京市自然科学基金项目(6092007)、北京市教委重点项目(KZ201010020016)、北京市教委平台建设项目和北京市属高校人才强教深化计划项目(PHR20090516和PHR200906134)。
* 共同通讯作者(E-mail: huabg@yahoo.com, wyn1951@126.com; Tel: 010-80797225)。

据显示, 其生物合成途径受到庞大而复杂的转录网络直接调控(Zhao和Dixon 2011)。NAC转录因子就是参与其中的重要的成员之一。

NAC (NAM, ATAF1/2, CUC2)转录因子为植物所特有, 其命名取自矮牵牛NAM、拟南芥ATAF1/2和CUC2的第一个字母，这些蛋白的N端都包含一段保守氨基酸序列(李鹏等2010)。这类转录因子在拟南芥、水稻和杨树中分别含有105个、75个和163个家族成员(Hu等2010; Kikuchi等2000; Ooka等2003)。大量研究表明NAC转录因子广泛参与顶端分生组织形成、花器官形态建成、叶片衰老和次生代谢物合成等调控过程(Olsen等2005)。其中的NST/SND1类转录因子是近年来发现的一类特异调控次生细胞壁形成和木质化的NAC转录因子(宋东亮等2010)。

据报道, 拟南芥NST1和SND1不仅冗余调控茎次生细胞壁的形成和木质化(Mitsuda等2005), 而且可以通过调控长角果内果皮层*b* (en*b*)的木质化影响果实开裂(Mitsuda和Ohme-Takagi 2008), 此外研究还发现NST1和NST2可以冗余调控花粉囊内皮层细胞次生细胞壁的生长(Mitsuda等2007)。Zhong等(2010a)在杨树中发现了与拟南芥NST1/SND1同源的、在木材发育过程中特异表达的PtrWND1A/1B/2A/2B, 并认为它们与拟南芥NST/SND1类转录因子类似, 是杨树中次生壁形成和木质化转录调控的关键核心。因此, 分析研究NST/SND1类转录因子在内果皮等特殊组织发育木质化过程中所扮演的角色，对于阐明果实内果皮发育形成机制具有重要的理论和应用价值。

桃是我国广泛栽培的重要果树作物, 同时也是国际公认的蔷薇科中的模式植物之一(Shulaev等2008), 其基因组已于2010年测序完成(http://www.rosaceae.org/peach/genome)。桃果实中高度木质化的内果皮通常被认为是食品加工和鲜食过程中产生的副产品与垃圾, 但有研究指出桃内果皮可以超量积累优质木质素, 因此可能成为潜在的生物质原料(biomass feedstock) (Arvelakis等2005; Mendu等2011)。目前有关桃内果皮发育木质化机制的系统研究尚处于起步阶段, 仅有Dardick等(2010)和Hu等(2011)分别从转录组学和蛋白质组学水平研究的报道。

在本文中, 我们以硬核期桃内果皮为试材, 克隆获得2个与拟南芥*NST1/2*和*SND1*同源的基因, 并对其编码蛋白的结构特征及其在硬核期内果皮和中果皮的表达特性进行分析, 以期为进一步研究桃内果皮发育木质化过程中的转录调控机制提供理论依据和研究线索。

材料与方法

1 试验材料

以桃‘久保’果实(*Prunus persica* L. ‘Okubo’)为材料。采样树为北京市平谷区试验果园中树势健壮, 生长较为一致, 采用常规栽培管理的六年生桃树5株, 自盛花期后每7 d从每株树外围长势相似的1年生结果枝上采取果实5个, 液氮速冻后–70 ℃保存。

2 *PpNST1*和*PpSND1*基因序列的克隆

我们以拟南芥NST1/2和SND1的氨基酸序列为信息探针, 使用BLASTP搜索桃基因组, 分别选取了相似度最高且E值最低的2条序列, 在其编码区序列两侧设计基因特异引物(NST1F: 5' ATGAGTATATCTGTAAATGGG 3', NST1R: 5' TTATATAGAACCGTTCGAC 3'; SND1F: 5' ATGGCTGAGGATCATATGAATC 3', SND1R: 5' TTATACAGACAAGTGGCACAG 3')。使用EASYspin植物RNA快速提取试剂盒(北京博迈德科技发展有限公司)提取盛花期后37 d内果皮的总RNA, 经PrimeScript 1st Strand cDNA Synthesis Kit (大连宝生物工程有限公司)合成cDNA 第一链, 并以此cDNA为模板, 采用50 μL反应体系进行PCR扩增, 反应程序为: 95 ℃预变性5 min; 94 ℃变性30 s, 61 ℃退火30 s, 72 ℃延伸1 min, 38次循环; 72 ℃延伸10 min。PCR产物经1%琼脂糖电泳检测后回收、纯化与并与pMD-19T载体连接后转化DH5α感受态细胞, 挑选阳性克隆交由上海生工生物工程技术服务公司进行测序。

3 PpNST1和PpSND1的生物信息学分析

使用ProtParam (http://web.expasy.org/protparam/)预测编码蛋白的理化性质; 使用Pfam 26.0 (http://pfam.sanger.ac.uk/)预测蛋白结构域; 使用SignalP 4.0 (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/)预测信号肽; 使用TMHMM 2.0 (http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/)预测跨膜区; 使用WoLF

PSORT (http://wolfpsort.org/)预测亚细胞定位; 使用ClustalW 2.1进行多重序列比对分析; 使用MEGA 5.0以Neighbor-Joining (NJ)算法和Poisson 模型构建系统进化树, 其中bootstrap值设为1 000。

4 木质素的组织化学染色与定量分析

将采集的果实沿缝合线纵切, 采用间苯三酚-盐酸染色法(Abeles和Biles 1991)检测内果皮木质素的沉积状况, 同时切取内果皮参照鞠志国(1991)方法测定木质素含量。

5 荧光实时定量PCR分析

使用PrimerExpress 3.0 (美国Applied Biosystems公司)软件设计荧光实时定量PCR引物(表1), 以TEF2 (translation elongation factor 2, 桃基因组位点ppa001368m)基因作为内参照(Tong等2009)。提取桃果实硬核期, 即盛花期后28、35、45、52和59 d的内果皮和中果皮的RNA, 经DNase I (美国Promega公司)处理后采用ReverTra Ace qPCR RT Kit (日本Toyobo公司)合成cDNA第一链。对所得cDNA稀释10倍后, 使用SYBR Premix *Ex Taq* (大连宝生物工程有限公司), 以25 μL反应体系在7300 Real-Time PCR System (美国Applied Biosystems公司)上进行荧光实时定 量PCR分析, 每个反转录样品重复4次试验。反应程序为: 95 ℃预变性30 s; 95 ℃变性5 s, 60 ℃退火31 s, 40次循环。反应程序结束后由仪器自动生成熔解曲线。使用$2^{-\Delta\Delta CT}$法计算在Excel中计算各检测基因相对于内参基因*TEF2*的表达量(Livak和Schmittgen 2001)。

表1 荧光实时定量PCR所使用的引物

Table 1 Primers for quantitative real-time PCR

基因名称	引物序列 (5'→3')
PpNST1	正向引物: GGAAGAAGAGAATGAAGGCAACA
	反向引物: TGGTGGAGTTTGGGCTGTCT
PpSND1	正向引物: AAGATGGGTGGGTGGTATGC
	反向引物: TCAAGCACCCCATCGTTTC
PpMYB63	正向引物: GATGTTCCATTAGTGCCATTTCAG
	反向引物: AAGCCACTTCTCATTTTCATGTTG
PpMYB85	正向引物: CTCATCAAGCTCACCACCAGAA
	反向引物: GAGTTTCATCCACCCACAGGTT
PpMYB46	正向引物: CCTCGGAGCCTAAAGATCATCA
	反向引物: CACCAACCGTAGACTGCATCA
PpMYB83	正向引物: CAGGACGAACGGACAATGAA
	反向引物: CTCTAGGCTCTGATGAATCACTATCG
PpTEF2	正向引物: GTTGCCTTGGTCGGTCTTGA
	反向引物: CAGAAGCCACCTTGCATTGA

结果与讨论

1 桃*PpNST1*和*PpSND1*基因的克隆

通过BLASTP程序检索桃基因组, 初步确定了分别与拟南芥NST1/2和SND1同源度最高的桃基因位点ppa020746m和ppa006801m (表2)。在基因组预测的编码区两侧设计基因特异性引物对反转录cDNA进行RT-PCR扩增, 获得2条大小约为1 200 bp的PCR产物。测序结果表明其长度均为1 188 bp, 与两者的桃基因组预测长度完全一致, 其中ppa020746m的碱基组成与基因组预测组成完全一致, 而ppa006801m则存在2个碱基的差异。我们将两者分别命名为*PpNST1*和*PpSND1*。

2 PpNST1和PpSND1的生物信息学与系统进化分析

*PpNST1*和*PpSND1*的基因编码区全长均为1 188 bp, 可编码396个氨基酸, 且两者氨基酸序列的相似度为67%。根据Pfam蛋白质结构域预测分析, 两者的N端均含有高度保守的、由165个氨基酸组成的NAC结构域, 为DNA结合功能区(Olsen等2005), 多重序列比对还确认两者的NAC结构域中都包含5个保守的亚结构域A~E (图1)。PpNST1和PpSND1的C端虽然差异较大, 但仍然含有NST/SND1类转录因子所特有的结构域LP-box和WQ-box (Ko等2007) (图1), 为转录激活功能区(Yamaguchi和Demura 2010)。ProtParam预测*PpNST1*和*PpSND1*编码蛋白的分子量分别为45 537.5和44 687.4 Da, 等电点分别为5.94和5.86。SignalP和TMHMM预测显示两者均不含信号肽和跨膜区。亚细胞定位

表2 拟南芥与桃的同源基因分析

Table 2 Analysis of homologous genes between *Arabidopsis thaliana* and *Prunus persica*

拟南芥基因位点	拟南芥基因位点注释	同源桃基因位点	BLASTP得分	E值
AT2G46770	ANAC043; NST1	ppa020746m	371	1e-103
AT3G61910	ANAC066; NST2	ppa020746m	323	7e-89
AT1G32770	ANAC012; SND1; NST3	ppa006801m	345	3e-95

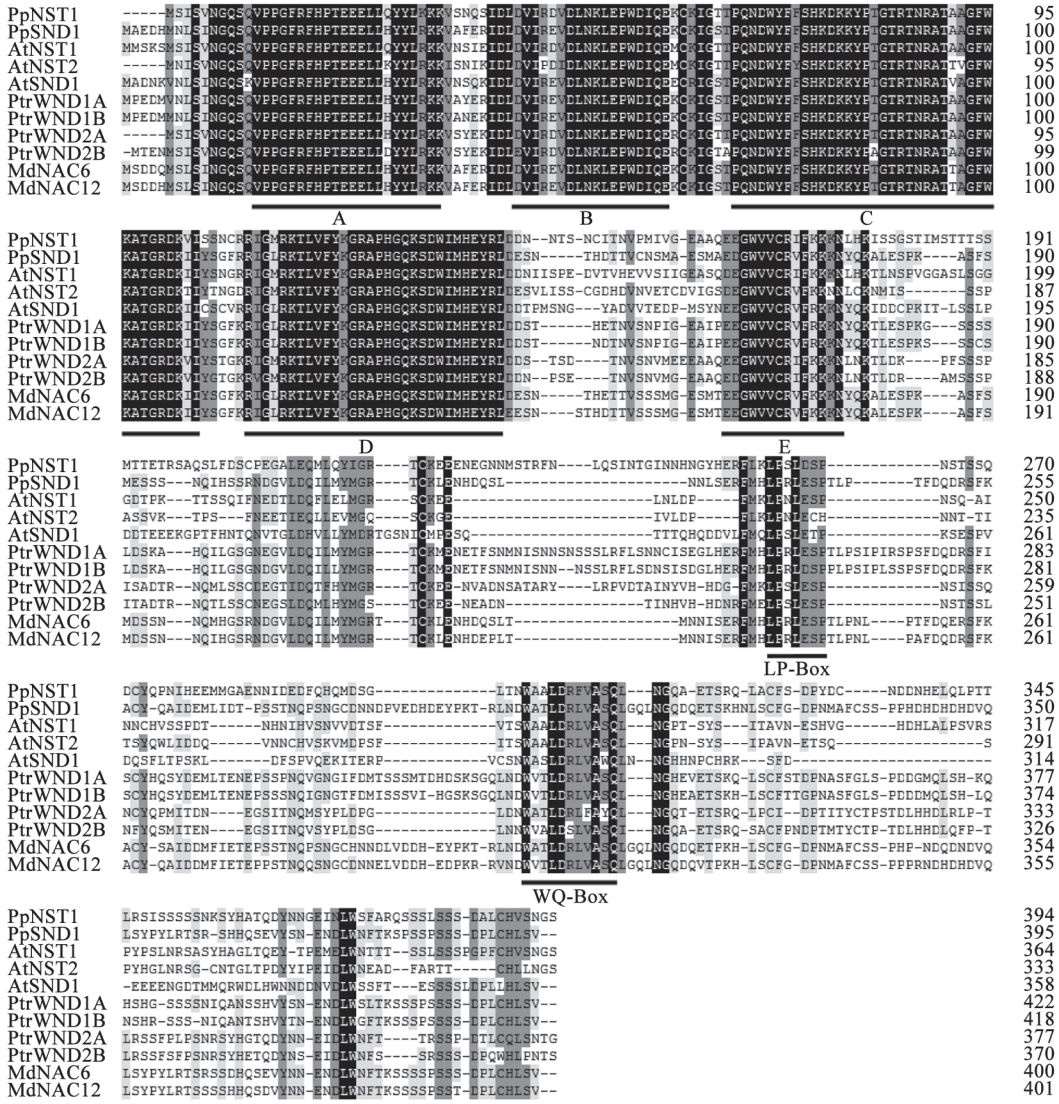

图1 PpNST1、PpSND1及其它植物NAC蛋白的多重序列比对分析

Fig.1 Multiple sequence alignment analysis of PpNST1, PpSND1 and NAC domain proteins from other plants

苹果(*Malus domestica*): MdNAC6 (ADL36808.1)、MdNAC12 (ADL36793.1); 毛果杨(*Populus trichocarpa*): PtrWND1A (ADR00330)、PtrWND1B (ADR00331)、PtrWND2A (ADR00332)、PtrWND2B (ADR00333); 拟南芥(*Arabidopsis thaliana*): AtNST1 (AEC10750)、AtNST2 (AEE80278)、AtSND1 (AEE31527)。

预测表明两者均定位于细胞核，这与已报道的拟南芥SND1 (Zhong等2006)和杨树PtrWND1B/2B (Zhong等2010a)亚细胞定位试验结果一致。

参考并重建Shen等(2009)的关于11种植物中1 232个NAC转录因子的聚类分析, 表明PpNST1、PpSND1与AtNST1/2、AtSND1均属于NAC-c亚家族中c-3亚组的NST/SND1亚分支(图2-A)。提取该亚分支中的相关蛋白序列与PpNST1和PpSND1进行系统进化分析。结果(图2-B)表明PpNST1和PpSND1的进化符合植物分类学的种属特征, 两者与葡萄(*Vitis vinifera*)和毛果杨(*Populus trichocarpa*)的相似度较高, 分别为67%~73%和62%~78%, 其中PpSND1与苹果(*Malus domestica*) MdNAC 6/12的相似度达92%, 而与拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)和蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*)的相似度较低, 分别为49%~67%和33%~47%。

3 *PpNST1*、*PpSND1*及其可能的下游转录因子在硬核期内果皮和中果皮的表达分析

为了准确确定桃果实发育的硬核期, 我们采用组织化学染色方法检测木质素的沉积动态, 并

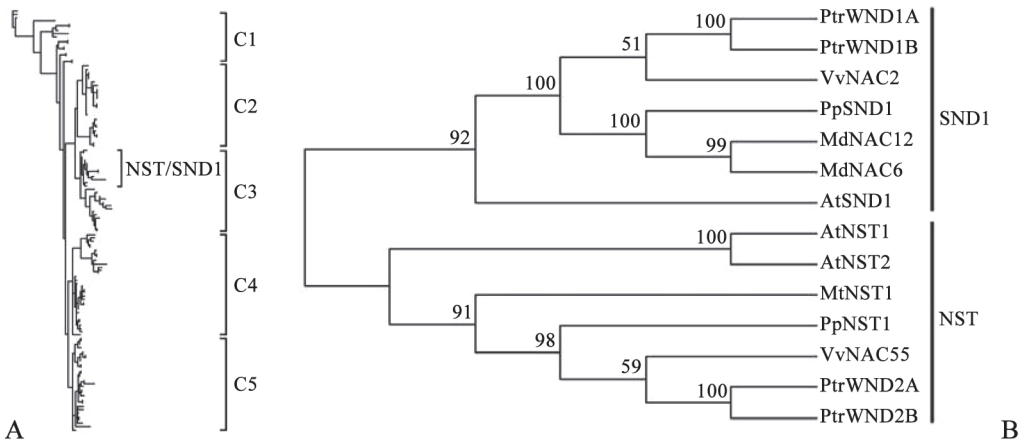

图2 PpNST1、PpSND1及其同源序列的系统进化分析

Fig.2 Phylogenetic analysis of PpNST1, PpSND1 and their homologs

A: NAC-c亚家族的系统进化树; B: c-3亚组NST/SND1亚分支的系统进化树。苹果(*Malus domestica*): MdNAC6 (ADL36808.1)、MdNAC12 (ADL36793.1); 葡萄(*Vitis vinifera*): VvNAC002 (XP_002279545)、 VvNAC055 (XP_002267383); 毛果杨(*Populus trichocarpa*): PtrWND1A (ADR00330)、PtrWND1B (ADR00331)、PtrWND2A (ADR00332)、PtrWND2B (ADR00333); 拟南芥(*Arabidopsis thaliana*): AtNST1 (AEC10750)、AtNST2 (AEE80278)、AtSND1 (AEE31527); 蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*): MtNST1 (ADK23700)。

对内果皮木质素进行定量分析。通过间苯三酚-盐酸染色法对内果皮木质素进行染色观察, 确认盛花期后35~59 d内果皮开始逐渐出现明显的木质素沉积(图3-A)。同时, 木质素定量分析结果也表明此期间内果皮木质素含量呈较为明显的线性增长的趋势(图3-B)。根据以上两个特点可以判断盛花期后35~59 d属于桃果实发育的硬核期。

分别提取盛花期后28、35、45、52和59 d的内果皮和中果皮的总RNA并反转录为cDNA, 以*TEF2*基因作为内参照, 采用荧光实时定量PCR方法对*PpNST1*和*PpSND1*进行相对表达量检测分析。熔解曲线分析显示*TEF2*、*PpNST1*和*PpSND1*均具有单一的特征峰, 其T_m值分别为83、82.5和81.5, 表明所用引物具有良好的特异性。

分别将盛花期后28 d内果皮和中果皮的表达量为设定为“1”, 采用$2^{-\Delta\Delta CT}$法进行作图分析。结果表明, 随着内果皮的发育, *PpNST1*表达量逐渐上升, 并在盛花期后59 d达到最大值(45.2倍), 而其在中果皮的表达量也有少许上升, 但远低于其内果皮中的表达量(图4)。在盛花期后52 d内果皮*PpSND1*, 出现极其显著的上调表达, 其表达量由之前的3倍突然增加至325.2倍, 达到最大值, 之后在59 d下降至96倍, 而其在中果皮中则无显著变化(图4)。Mitsuda和Ohme-Takagi (2008)报道了NST1和SND1可

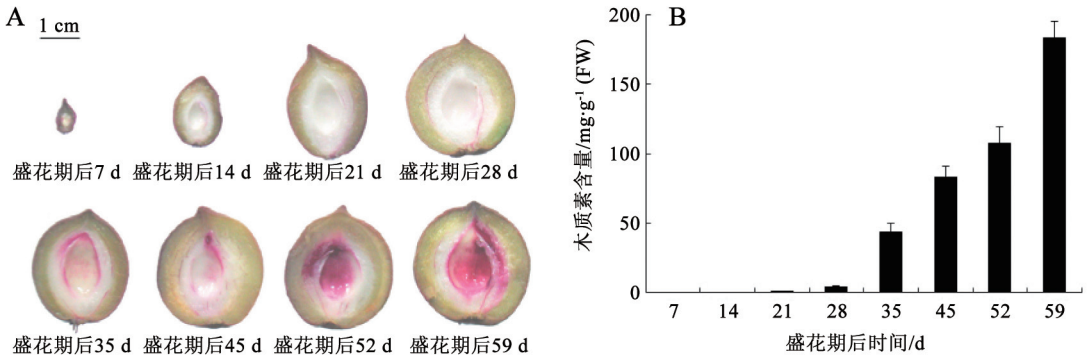

图3 桃内果皮木质素沉积过程及木质素含量的检测

Fig.3 Assay of lignin deposition process and lignin content in peach endocarp

A: 使用间苯三酚-盐酸对桃果实进行染色; B: 桃内果皮木质素含量测定。

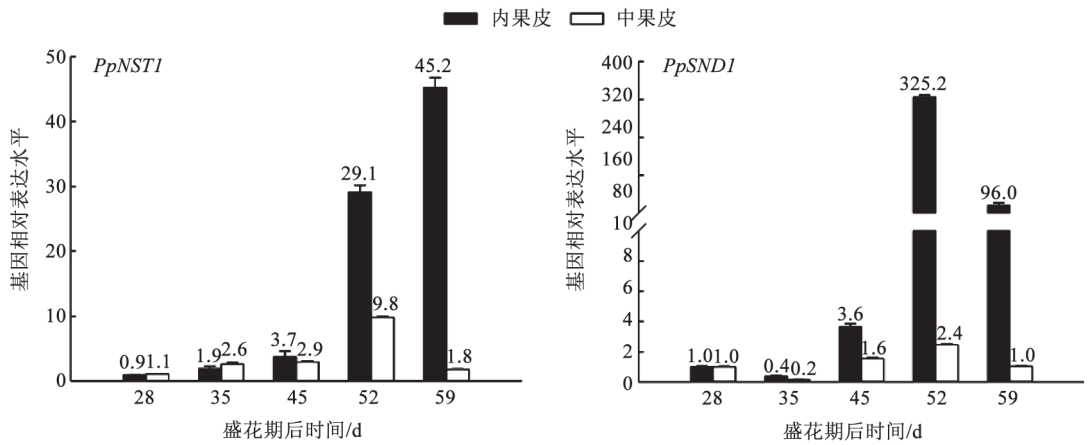

图4 桃果实发育过程中*PpNST1*和*PpSND1*相对表达水平的比较

Fig.4 Comparison of relative expression levels of *PpNST1* and *PpSND1* during peach fruit development

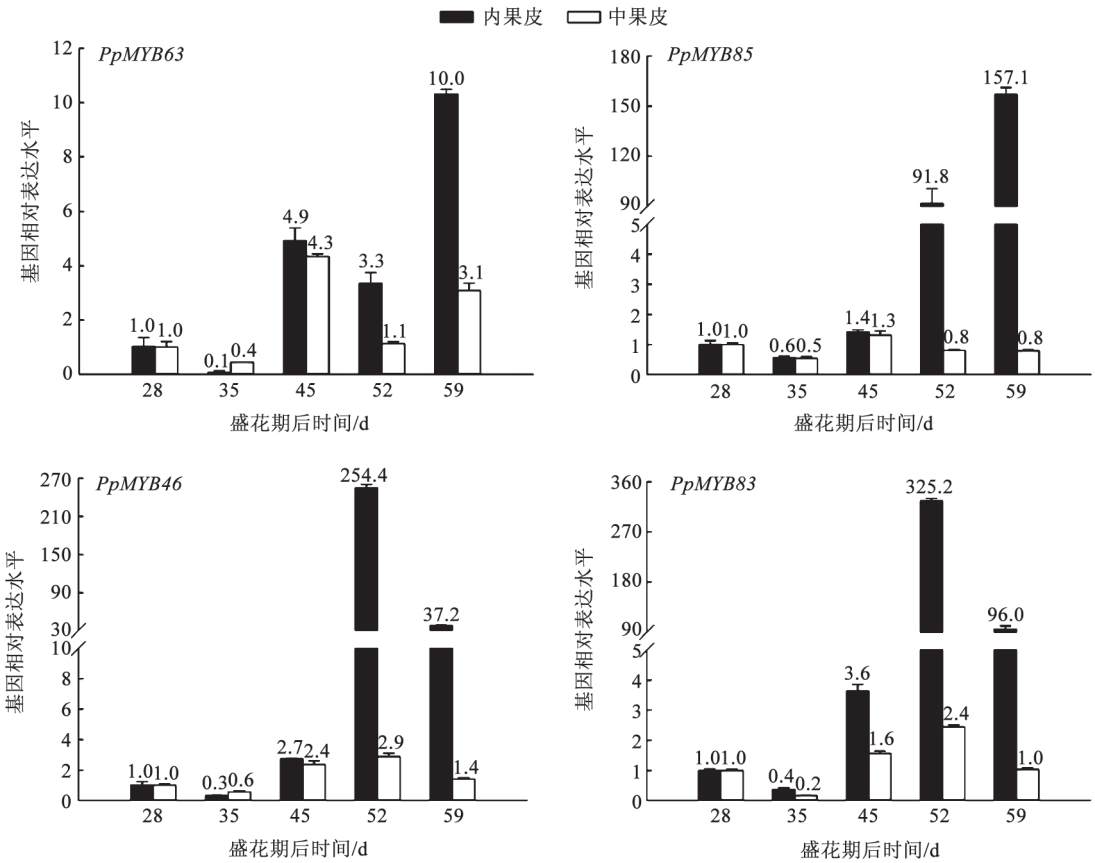

图5 桃果实发育过程中*PpMYB63*、*PpMYB85*、*PpMYB46*和*PpMYB83*相对表达水平的比较

Fig.5 Comparison of relative expression levels of *PpMYB63, PpMYB85, PpMYB46* and *PpMYB83* during peach fruit development

以冗余调控拟南芥长角果内果皮层*b*和胎座框周围维管束的木质化，且发现它们的启动子活性都会随着木质化程度的发展而逐渐增强。虽然拟南芥长角果与桃的核果在解剖结构上存在较大差异，但这一报道与我们有关*PpNST1*和*PpSND1*的表达分析结果类似。

大量研究证据显示NST1和SND1可能是次生细胞壁形成和木质化信号途径的“总开关” (Zhong等2008, 2010b; Zhong和Ye 2007, 2009), 两者都可以直接作用于下游一系列转录因子的启动子区, 并激活它们的表达, 它们的具体作用机制大致包括两种类型: (1) NST1和SND1直接调控可以作用于木质素单体生物合成途径相关酶类基因的转录因子, 如MYB58/63/85等; (2) NST1和SND1直接调控第二级转录因子(如MYB46/83等), 并由这些转录因子进一步调控第三级转录因子(如MYB42/43/52/54/69/103、SND2、KNAT7等)的表达, 最后由这些第三级转录因子调控次生壁形成相关酶类基因。

为了检测这些NST1和SND1直接调控的下游基因是否被激活表达, 我们通过搜索桃基因组, 寻找到了分别与拟南芥*MYB58/63*、*MYB85*、*MYB46*、*MYB83*基因同源的ppa026315m (*PpMYB63*)、ppa021568m (*PpMYB85*)、ppa009566m (*PpMYB46*)、ppa016923m (*PpMYB83*), 并对它们进行了荧光实时定量PCR分析。结果表明这些基因的表达量均在盛花期后52或59 d出现显著的上调表达(图5)。这些结果与先前在拟南芥和杨树中的报道基本一致, 表明尽管不同种属的植物在形态解剖学上大相径庭, 但它们在次生壁形成和木质化的转录调控机制上却相当高度保守, 并且很有可能起源自同一祖先。此外，我们还发现内果皮中*PpNST1*和*PpSND1*分别与*PpMYB63/85*和*PpMYB46/83*的表达模式类似，即它们的表达峰值分别出现于盛花期后59和52 d (图5)，由此推测它们之间的表达可能存在一定关联。但有关它们的具体作用机制和调控网络尚需进一步的突变体互补和转基因试验进行验证。

参考文献

鞠志国(1991). 采期对莱阳茌梨酚类物质代谢和组织褐变的影响. 中国农业科学, 24 (2): 63~38

李鹏, 黄耿青, 李学宝(2010). 植物NAC转录因子. 植物生理学通讯, 46 (2): 294~300

宋东亮, 沈君辉, 李来庚(2010). 植物维管系统形成的调节机制. 植物生理学通讯, 46 (5): 411~422

Abeles FB, Biles CL (1991). Characterization of peroxidases in lignifying peach fruit endocarp. Plant Physiol, 95 (1): 269~273

Arvelakis S, Gehrmann H, Beckmann M, Koukios EG (2005). Preliminary results on the ash behavior of peach stones during fluidized bed gasification: evaluation of fractionation and leaching as pretreatments. Biomass Bioenerg, 28 (3): 331~338

Boerjan W, Ralph J, Baucher M (2003). Lignin biosynthesis. Annu Rev Plant Biol, 54 (1): 519~546

Dardick C, Callahan A, Chiozzotto R, Schaffer R, Piagnani MC, Scorza R (2010). Stone formation in peach fruit exhibits spatial coordination of the lignin and flavonoid pathways and similarity to *Arabidopsis* dehiscence. BMC Biol, 8 (1): 13

Hu H, Liu Y, Shi GL, Liu YP, Wu RJ, Yang AZ, Wang YM, Hua BG, Wang YN (2011). Proteomic analysis of peach endocarp and mesocarp during early fruit development. Physiol Plant, 142 (4): 390~406

Hu R, Qi G, Kong Y, Kong D, Gao Q, Zhou G (2010). Comprehensive analysis of NAC domain transcription factor gene family in *Populus trichocarpa*. BMC Plant Biol, 10 (1): 145

Kikuchi K, Ueguchi-Tanaka M, Yoshida KT, Nagato Y, Matsusoka M, Hirano HY (2000). Molecular analysis of the *NAC* gene family in rice. Mol Genet Genomics, 262 (6): 1047~1051

Ko JH, Yang SH, Park AH, Lerouxel O, Han KH (2007). ANAC012, a member of the plant-specific NAC transcription factor family, negatively regulates xylary fiber development in *Arabidopsis thaliana*. Plant J, 50 (6): 1035~1048

Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Methods, 25 (4): 402~408

Marjamaa K, Kukkola EM, Fagerstedt KV (2007). Lignification in development. Int J Plant Dev Biol, 1 (1): 160~169

Mendu V, Harman-Ware A, Crocker M, Jae J, Stork J, Morton S, Placido A, Huber G, DeBolt S (2011). Identification and thermochemical analysis of high-lignin feedstocks for biofuel and biochemical production. Biotechnol Biofuels, 4 (1): 43

Mitsuda N, Iwase A, Yamamoto H, Yoshida M, Seki M, Shinozaki K, Ohme-Takagi M (2007). NAC transcription factors, NST1 and NST3, are key regulators of the formation of secondary walls in woody tissues of *Arabidopsis*. Plant Cell, 19 (1): 270~280

Mitsuda N, Ohme-Takagi M (2008). NAC transcription factors NST1 and NST3 regulate pod shattering in a partially redundant manner by promoting secondary wall formation after the establishment of tissue identity. Plant J, 56 (5):768~778

Mitsuda N, Seki M, Shinozaki K, Ohme-Takagi M (2005). The NAC transcription factors NST1 and NST2 of *Arabidopsis* regulate secondary wall thickenings and are required for anther dehiscence. Plant Cell, 17 (11): 2993~3006

Olsen AN, Ernst HA, Leggio LL, Skriver K (2005). NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse. Trends Plant Sci, 10 (2): 79~87

Ooka H, Satoh K, Doi K, Nagata T, Otomo Y, Murakami K, Matsubara K, Osato N, Kawai J, Carninci P et al (2003). Comprehensive analysis of NAC family genes in *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*. DNA Res, 10 (6): 239~247

Shen H, Yin Y, Chen F, Xu Y, Dixon R (2009). A bioinformatic analysis of *NAC* genes for plant cell wall development in relation to lignocellulosic bioenergy production. Bioenergy Res, 2 (4): 217~232

Shulaev V, Korban SS, Sosinski B, Abbott AG, Aldwinckle HS, Folta

KM, Iezzoni A, Main D, Arus P, Dandekar AM et al (2008). Multiple models for Rosaceae genomics. Plant Physiol, 147 (3): 985~1003

Tong Z, Gao Z, Wang F, Zhou J, Zhang Z (2009). Selection of reliable reference genes for gene expression studies in peach using real-time PCR. BMC Mol Biol, 10 (1): 71

Yamaguchi M, Demura T (2010). Transcriptional regulation of secondary wall formation controlled by NAC domain proteins. Plant Biotechnol, 27 (3): 237~242

Zhao Q, Dixon RA (2011). Transcriptional networks for lignin biosynthesis: more complex than we thought? Trends Plant Sci, 16 (4): 227~233

Zhong R, Demura T, Ye ZH (2006). SND1, a NAC domain transcription factor, is a key regulator of secondary wall synthesis in fibers of *Arabidopsis*. Plant Cell, 18 (11): 3158~3170

Zhong R, Lee C, Ye ZH (2010a). Functional characterization of poplar wood-associated NAC domain transcription factors. Plant Physiol, 152 (2): 1044~1055

Zhong R, Lee C, Ye ZH (2010b). Evolutionary conservation of the transcriptional network regulating secondary cell wall biosynthesis. Trends Plant Sci, 15 (11): 625~632

Zhong R, Lee C, Zhou J, McCarthy RL, Ye ZH (2008). A battery of transcription factors involved in the regulation of secondary cell wall biosynthesis in *Arabidopsis*. Plant Cell, 20 (10): 2763~2782

Zhong R, Ye ZH (2007). Regulation of cell wall biosynthesis. Curr Opin Plant Biol, 10 (6): 564~572

Zhong R, Ye ZH (2009). Transcriptional regulation of lignin biosynthesis. Plant Signal Behav, 4 (11): 1028~1034