

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Ondřej Gargoš

Lignin a mechanismy lignifikace

Lignin and lignification mechanisms

Bakalářská práce

Vedoucí práce: **RNDr. Edita Tylová, Ph.D.**

Konzultant: **RNDr. Aleš Soukup, Ph.D.**

Praha, 2019

Poděkování

Mé obrovské díky patří RNDr. Editě Tylové, Ph.D., která mou práci vedla, za odborné rady, pečlivost a čas, který mé práci věnovala. Dále bych jí rád poděkoval za přátelský přístup, milá slova a podporu. Mé poděkování patří také RNDr. Michalu Hálovi, Ph.D. za jeho pomoc s českými názvy enzymů. V neposlední řadě děkuji také své rodině a blízkým za zázemí a oporu.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 10.5.2019

Podpis

Abstrakt

Lignin je nezbytnou součástí všech cévnatých rostlin. Novější výzkumy dokazují jeho přítomnost také u některých rostlin bezcévných. Lignin je pro své vlastnosti důležitý pro růst a vývoj rostliny, mechanickou odolnost pletiv a také hraje roli v odpovědi na stresové podmínky. Lignin je aromatický heteropolymer, tvořený hlavně klasickými ligninovými jednotkami – guajacylem (G), syringylem (S) a *p*-hydroxyfenylem (H). Ligninové jednotky se ukládají v různém množství a poměru, což vede k rozmanité struktuře, a to nejen na úrovni druhové, ale také na úrovni jednotlivých orgánů či typů buněk. Rozmanitost ligninu zvyšují také “netradiční“ monomery. Lignifikace, tedy tvorba a ukládání ligninu, je složitý a přesně řízený proces, který zahrnuje syntézu monolignolů v cytoplasmě, jejich transport do buněčné stěny a následnou polymeraci. Procesu lignifikace se účastní celá řada enzymů a recentní studie postupně odhalují mechanismy regulace lignifikace v různých buňkách rostlinného těla. Cílem této bakalářské práce je proto shrnutí poznatků o významu, syntéze a ukládání ligninu, dále porovnání mechanismů regulujících lignifikaci u různých typů rostlinných buněk – cévních elementů, sklerenchymatických buněk a buněk endodermis. Zajímavé je, že lignifikace v xylému probíhá částečně buněčně neautonomně. K lignifikaci cévních elementů přispívají syntézou monolignolů okolní živé parenchymatické buňky. Vznik Casparyho proužků v endodermis naopak představuje velmi specificky řízenou lokální depozici ligninu do buněčné stěny pouze v místě vznikajícího Casparyho proužku.

Klíčová slova

Lignin, Monolignoly, Fenylpropanoidní dráha, Lignifikace, Cévní elementy, Sklerenchym, Casparyho proužky

Abstract

Lignin is an essential compound of all vascular plants. Recent studies have also shown its presence in non-vascular plants. Lignin is important for plant growth and development, provides a mechanical support to plant tissues and is also a major player in the response of plants to various stresses. Lignin is an aromatic heteropolymer and comprises classical lignin units – guaiacyl (G), syringyl (S) and p-hydroxyphenyl (H). The amount and ratio of these lignin units varies among plant species, organs and cell types. Nontraditional monomer units that can be deposited in lignin also increase the variety of lignin. Lignification, i.e. the formation and deposition of lignin, is a complex and precisely controlled process involving the synthesis of monolignols in the cytoplasm, their transport into the cell wall and subsequent polymerization. A number of enzymes are involved in the lignification process, and recent studies are gradually revealing the mechanisms of lignification regulation in various cells of plant body. This bachelor thesis summarizes the knowledge of the importance, synthesis and deposition of lignin, and also compares the mechanisms regulating lignification in different types of plant cells – tracheary elements, sclerenchyma and endodermal cells. An interesting phenomenon of lignification in xylem is the fact that it is partially non-cell autonomous. Living neighbouring parenchyma cells, which synthesize monolignols, contribute to lignification of tracheary elements. Conversely, the formation of the Casparian bands in the endodermis represents a very specifically directed local deposition of lignin into the cell wall only at the site of the emerging Casparian band.

Key words

Lignin, Monolignols, Phenylpropanoid pathway, Lignification, Tracheary elements, Sclerenchyma cells, Casparian bands

Obsah

Seznam použitých zkratek	1
1. Úvod	3
2. Lignin	4
2.1. Struktura ligninu	4
2.2. Lignin v evolučním kontextu	6
3. Lignifikace	8
3.1. Syntéza monolignolů	8
3.2. Transport monolignolů	14
3.3. Polymerace ligninu	15
3.4. Regulace lignifikace	16
4. Mechanismus lignifikace u různých typů buněk	16
4.1. Vodivá pletiva	17
4.2. Sklerenchym	20
4.3. Casparyho proužky	20
5. Indukovaná lignifikace	25
6. Závěr	26
7. Seznam literatury	27

SEZNAM ZKRATEK

4CL	4-kumarát:koenzymA-ligáza (z angl. 4-Coumarate:CoA Ligase)
ABC	Transportéry ABC typu (z angl. ATP Binding Casette)
AtABCG29/PDR1	ABC transportér z podskupiny PDRP1 u <i>Arabidopsis thaliana</i> (z angl. Pleiotropic Drug Resistance)
C3H	p-kumarát-3-hydroxyláza (z angl. p-coumarate 3-hydroxylase)
C4H	Cinamát 4-hydroxyláza (z angl. Cinnamate 4-hydroxylase)
CAD	Cinnamylalkoholdehydrogenáza (z angl. Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase)
CASP	Proteiny membránové domény Casparyho proužku (z angl. Casparian Strip Membrane Domain Proteins)
CCoAOMT	Kafeyol-CoA-O-methyltransferáza (z angl. Caffeoyl-CoA O-methyltransferase)
CCR	Cinnamyl-CoA-reduktáza (z angl. Cinnamoyl-CoA Reductase)
CIF	Casparian Integrity Factor
CoA	Koenzym A (z angl. Coenzyme A)
COMT	O-methyltransferáza (z angl. Caffeic acid O-methyltransferase)
CP	Casparyho proužek
CSD	Membránová doména Casparyho proužků (z angl. Casparian Strip membrane Domain)
CYP84, 98	Cytochrom P450 dependentní monooxygenáza 84, 98 (z angl. Cytochrome P450 dependent monooxygenase)
DIR	Dirigent protein
ESB1	Dirigent protein ESB1 (z angl. Enhanced Suberin 1)
F5H	Ferulát-5-hydroxyláza (z angl. Ferulate-5-hydroxylase)
G	Guaiacyl
GFP	Zelený fluorescenční protein (z angl. Green Fluorescent Protein)
H	<i>p</i> – hydroxyfenyl
H₂O₂	Peroxid vodíku
LAC4, 11, 17	Lakáza 4, 11, 17 (z angl. Laccase)
LRR-RLK	Receptorová kináza s doménou bohatou na leucin (z angl. Leucin-rich-repeat Receptor-like Kinase)

LOTR	Protein regulující vznik Casparyho proužků (z angl. Lord Of The Ring)
MYB36, 46, 83, 85	Transkripční faktory s MYB doménou (z angl. Myb Domain Protein 36, 46, 83, 85)
NST1	Transkripční faktor s NAC (NAM, ATAF1/2, CUC2) doménou regulující ukládání sekundární stěny (z angl. Nac Secondary wall Thickening promoting factor1)
PAL	Fenylalaninamoniaklyáza (z angl. Phenylalanine Ammonia-lyase)
PER03, 09, 64, 72	Peroxidáza 03, 09, 64, 72 (z angl. Peroxidase)
S	Syringyl
SGN3	Receptorová kináza ze skupiny LRR-RLK, podílející se na vzniku Casparyho proužků (z angl. Schengen3)
SGN4/RBOHF	Oxidáza podílející se na lignifikaci Casparyho proužků (z angl. Schengen4/Respiratory Burst Oxidase Homolog F)
SND1/NST3	Transkripční faktor s NAC (NAM, ATAF1/2, CUC2) doménou regulující ukládání sekundární stěny (z angl. Secondary wall-associated Nac Domain protein1/ Nac Secondary wall Thickening promoting factor3)
SND2	Transkripční faktor s NAC (NAM, ATAF1/2, CUC2) doménou regulující ukládání sekundární stěny (z angl. Secondary wall-associated Nac Domain protein2)
TPST/SGN2	Sulfotransferáza regulující vznik Casparyho proužků (z angl. Tyrosylprotein Sulfotranferaze/Schengen2)
VND6, 7	Transkripční faktor s NAC (NAM, ATAF1/2, CUC2) doménou regulující ukládání sekundární stěny (z angl. Vascular related nac Domain TF6, 7)

1. ÚVOD

Lignin je po celulóze nejrozšířenějším přírodním polymerem na planetě Zemi (Boerjan a kol., 2003). Název lignin pochází z latinského *lignum*, v českém překladu dřevo. Ve starší literatuře se můžeme setkat s názvem *native lignin* nebo *protolignin* (Brauns, 1952). Pro své vlastnosti se stal lignin klíčovým v období přechodu rostlin z vodního prostředí do prostředí terestrického. Zajistil díky svým vlastnostem lepší adaptaci rostlin na nové prostředí (Boyce a kol., 2004; Martone a kol., 2009). Lignin se nachází ve všech cévnatých rostlinách (Boerjan a kol., 2003), novější výzkumy však dokazují, že se lignin nachází i v některých bezcévných rostlinách (Martone a kol., 2009).

U cévnatých rostlin se lignin ukládá v různých typech buněk a může mít více než jednu funkci. Mezi nejvýraznější funkce patří mechanická odolnost buněčných stěn, čímž je umožněn růst rostliny do výšky, stabilitu cévních elementů nezbytnou pro transport vody a minerálních látek po celé rostlině i do velkých vzdáleností, ochranu před těžkými kovy, patogeny a dalšími nežádoucími látkami (Boerjan a kol., 2003; Campbell a Sederoff, 1996; Fahn, 1990). Lignin je důležitou součástí např. vodivých pletiv, sklerenchymu, osemení, endodermálních a exodermálních Casparyho proužků (Barros a kol., 2015). Lignin hraje významnou roli v odpovědi rostlin na stresové faktory, např. může docházet k indukované lignifikaci v okolí místa poranění.

Vodivá pletiva představují nezbytnou část suchozemských cévnatých rostlin, vzhledem k jejich schopnosti transportovat vodu, organické a anorganické látky po celém těle rostliny. Vodivá pletiva jsou tvořena dřevní a lýkovou částí, xylémem a floémem. Xylém zajišťuje transport vody a minerálních látek z kořene do prýtu, floém zajišťuje transport asimilátů (látek vzniklých fotosyntézou) z místa zdroje do místa spotřeby. (Fahn 1990; Votrubová 1997). Lignin je klíčový v sekundárních buněčných stěnách xylému, kde zajišťuje vysokou pevnost a odolnost těchto buněk, což je nezbytné pro jejich schopnost zajistit xylémový tok (Boyce a kol., 2004).

Sklerenchym slouží díky lignifikaci buněčných stěn jako mechanická opora především u základních rostlinných pletiv, nalezneme ho však i ve vodivých a krycích pletivech. Vyskytuje se ve formě sklerenchymatických vláken nebo sklereid (Fahn 1990).

Velmi speciální typ lignifikace představují Casparyho proužky, které se nacházejí v kořenové endodermis (v některých případech i exodermis) cévnatých rostlin. Endodermis je nejněvnější vrstva primární kůry a obklopuje střední válec – stélé, ve kterém se nacházejí

vodivá pletiva. Exodermis je vnější vrstva primární kůry. Casparyho proužky jsou lignifikované, popřípadě suberinizované, oblasti buněčných stěn endodermálních (exodermálních) buněk, které tvoří efektivní apoplastickou bariéru (Enstone a Peterson, 1997; Perumalla a Peterson, 1986).

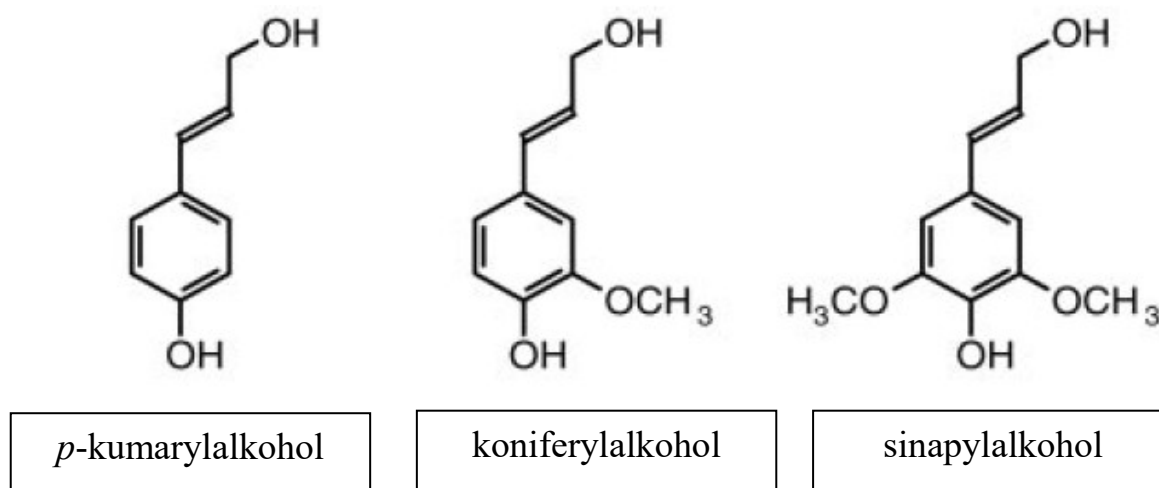
Tato bakalářská práce si klade za cíl stručně shrnout dosavadní poznatky o struktuře a syntéze ligninu v cévnatých rostlinách. Jako hlavním cílem se pak zabývá mechanismy lignifikace u různých typů rostlinných buněk – především cévních elementů, sklerenchymu a endodermálních buněk s Casparyho proužky. Dále popisuje indukovanou lignifikaci a okrajově představuje lignin v jeho evolučním kontextu.

2. LIGNIN

2.1 Struktura ligninu

Lignin je hydrofobní, racemický, aromatický heteropolymer. Lignin se označuje jako heteropolymer z důvodu jeho nepravidelné struktury. U ligninu nenalezneme pevnou strukturu, ani pravidelně opakující se úseky. Jak shrnuje Boerjan a kol., (2003), hlavními stavebními kameny ligninu jsou ligninové prekurzory nazývané monolignoly. Jsou to nestálé, toxické látky, které rostliny nemohou ukládat ve velkém množství a musí je stabilizovat glykosylací fenol-hydroxylové skupiny (Whetten a Sederoff, 1995). Monolignoly jsou tři hydroxyskořicové (hydroxycinnamyl) alkoholy, které se od sebe liší stupněm metoxylace: koniferylalkohol (M1G koniferyl alcohol), sinapylalkohol (M1S sinapyl alcohol) a *p*-kumarylalkohol (M1H *p*-coumaryl alcohol) (obrázek č. 1) (Boerjan a kol., 2003; Campbell a Sederoff, 1996). Koniferylalkohol obsahuje jednu -arylOCH₃ skupinu, sinapylalkohol obsahuje tyto skupiny dvě, a *p*-kumarylalkohol neobsahuje žádnou (Davin a Lewis, 2005). Monolignoly vytvářejí ligninové podjednotky, které se nazývají guajacyl (G), syringyl (S) a *p*-hydroxyfenyl (H) (Boerjan a kol., 2003). Dále se také mohou do ligninu inkorporovat jiné látky než jen monolignoly, například hydroxyskořicové aldehydy, hydroxyskořicové kyseliny, dihydrokoniferyl alkohol, ferulátové monolignoly a další (Zhao, 2016). Díky tomu vzniká ve výsledném polymeru značná rozmanitost. Za zmínku dále stojí i nedávno popsány homopolymer caffeoyl alkoholu – C jednotky, které se nachází např. u *Vanilla planifolia* nebo u některých Cactaceae (Chen a kol., 2012).

Jak shrnuje Vanholme a kol., 2010, struktura, množství i složení ligninu se liší v závislosti na rostlinném druhu. Dalšími faktory mohou být růstová fáze, ve které se daná rostlina nachází, věk rostliny, nepříznivé podmínky okolí, a další. Druhové rozdíly nacházíme i v poměru ligninových jednotek. Nahosemenné rostliny (*Pinophyta*) mají lignin složený převážně z G jednotek, pouze ojediněle se u nich mohou vyskytnout H jednotky. S jednotky se u nich nevyskytují vůbec (Creighton a kol., 1944). Zvláštní případ však tvoří jinan dvoulaločný (*Ginkgo biloba*), který řadíme k nahosemenným. U jinanu byla objevena dráha k syntéze S – jednotek, ale pouze v buněčné kultuře, nikoliv celistvých rostlinách (Novo Uzal a kol., 2009), přestože u ostatních nahosemenných tato dráha chybí (Creighton a kol., 1944). U krytosemenných rostlin (*Magnoliophyta*) se lignin skládá z G a S jednotek, obsah G jednotek se pohybuje okolo 35-49%, obsah S jednotek okolo 40-61% a stopové množství H jednotek. Trávy však obsahují větší množství H jednotek, a to okolo 4-15% H jednotek (Kumar a kol., 2016; Vogel, 2008). Kaprad'orosty (*Monilophyta*) obsahují jednotky H a G. Přesličky (*Equisetophyta*) a *Dennstaedtiaceae*, které také patří do skupiny kaprad'orostů, obsahují navíc ještě jednotky S. Plavuně (*Lycophyta*) obsahují jednotky H a G, avšak třída vranečků (*Selaginellopsida*) obsahuje navíc jednotky S (Jin a kol., 2005). Struktura, množství i složení ligninu se také může lišit v různých typech buněk v rostlině (Donaldson, 1994). Například u smrku černého (*Picea mariana*) bylo zjištěno, že hlavní složkou střední lamely jsou H jednotky, naopak G jednotky jsou více zastoupeny v sekundárních buněčných stěnách xylému (Whiting a Goring, 1982).



Obr. 1: Hydroxyskořicové alkoholy – *p*-kumarylalkohol, koniferylalkohol a sinapylalkohol

Převzato a upraveno z: *Hatfield a Wermerris (2001)*

2.2 Lignin v evolučním kontextu

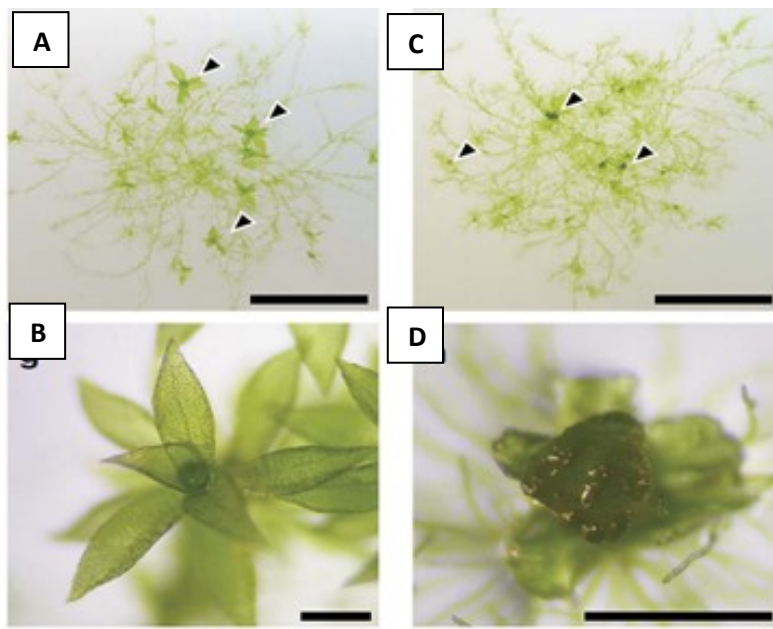
Důkazy o metabolismu monolignolů a jejich syntéze v raně terestrických rostlinách potvrzují fakt, že lignin byl klíčový v době před 480 – 360 miliony let, při procesu přechodu rostlin z vodního do terestrického prostředí (Kenrick a Crane, 1997). Molekulární fylogenetická data naznačují, že se suchozemské rostliny vyvinuly ze streptofytních řas (De Vries a Archibald, 2018). U odvozenějších zástupců současných streptofytních řas byly detekovány ligninu podobné komponenty. Konkrétně u několika zástupců rodu *Coleochaeta* byly imunodetekcí i biochemickými metodami detekovány ligninu podobné polymery vznikající radikálovou polymerací hydroxyškořicových alkoholů (Sørensen a kol., 2011). U bazálnějších streptofytních řas (např. u *Klebsormidium flaccidum*) pak byly nalezeny ortology fenylalaninamoniaklyázy, tedy klíčového enzymu stojícího na začátku fenylpropanoidní dráhy vedoucí k syntéze monolignolů. Je tedy pravděpodobné, že stavba buněčné stěny a výskyt ligninových polymerů byla klíčová pre-adaptace pro evoluci suchozemských rostlin z této skupiny řas (Sørensen a kol., 2011).

Dříve platila představa, že lignin byl evoluční novinkou jen cévnatých rostlin a jejich předchůdců, a dnes se nalézá pouze v této skupině rostlin. Recentně však byl detekován pravý lignin u *Calliarthron cheilosporioides* z kmene ruduch. V této ruduše byla objevena sekundární buněčná stěna a všechny tři ligninové jednotky (H, G a S). Zde má lignin nejpravděpodobněji ochrannou funkci proti mikroorganismům a proti UV záření. Toto zjištění přineslo mnoho dalších otázek ohledně konvergentní evoluce (Martone a kol., 2009). Konvergentní evoluce označuje takový druh evoluce, kdy se u nepříbuzných organismů tlakem okolí mohou vyvinout stejné komponenty.

Dále lze zmínit evolučně nejmladší vyšší rostliny, které nemají vyvinuté pravé cévní svazky, a to jsou mechorosty (Bryophyta). Přestože nepanuje jednoznačná shoda o fylogenetických vztazích mezi cévnatými rostlinami (Tracheophyta) a jednotlivými skupinami mechorostů (hlevíky, játrovky a mechy) (Puttick a kol., 2018), lze obecně říci, že se u mechorostů nenachází pravý lignin (Weng a Clint, 2010). Hromadí se pouze flavonoidy a lignany – dehydrodimery monolignolů (Basile a kol., 1999; Cullmann a Becker, 1999; Takeda a kol., 1990). Je však zajímavé, že konkrétně u *Physcomitrella patens* můžeme nalézt ortology všech enzymů potřebných pro syntézu *p*-kumarylalkoholu a koniferylalkoholu, jak shrnují Weng and Clint 2010. Konkrétně byly nalezeny například čtyři ortology 4CL (4-kumarát:koenzymA-ligáza) (Silber a kol., 2008).

Recentní práce týmu Renault a kol. (2017) navíc ukazuje, že pre-ligninová dráha je u *Physcomitrella patens* nezbytná pro správný vývoj rostliny. Tato práce se zaměřuje na tvorbu kutikulárních biopolymerů u *P. patens*, které vznikají dráhou kyseliny askorbové a jsou pro *P. patens* nezbytné. V jedné z částí této dráhy dochází k přeměně kyseliny threonové na *p*-kumaroyl-CoA, následuje přeměna na *p*-kumaroyl-threonát až ke caffeoyl-threonátu, a to díky enzymu z rodiny CYP98 (patřící mezi cytochrom P450 dependentní monooxygenázy). Konečným produktem této dráhy jsou kutikulární biopolymery. U krytosemenných rostlin probíhá fenyylpropanoidní dráha (popsána podrobně v následující kapitole) začínající kyselinou šikimovou, dále se v této dráze nachází *p*-kumaroyl-CoA, který je díky enzymu rodiny CYP98 měněn na *p*-kumaroyl-šikimát. Celý proces je zakončený ligninem. Výskyt enzymů ze stejné rodiny prokazuje blízkost těchto drah (Renault a kol., 2017).

Gen *PpCYP98* je u *P. patens* exprimován ve vyvíjejících se gametoforech, reprodukčních orgánech, embryích a sporofytech. Mutace v genu *PpCYP98* způsobuje přerušení dráhy kyseliny askorbové, tudíž nedojde k tvorbě kutikulárních biopolymerů, což vede k neschopnosti růst do výšky a výrazným deformacím ve vývoji gametoforů (obrázek č. 2) (Renault a kol., 2017).



Obr.2: Vzhled *Physcomitrella patens* bez narušení syntézy kutikulárních polymerů – rostliny divokého typu (A, B); *Physcomitrella patens* s narušenou funkcí genu *PpCYP98* vykazující defekty ve vývoji gametoforů (C, D)

Převzato a upraveno z: Renault a kol. 2017

3. LIGNIFIKACE

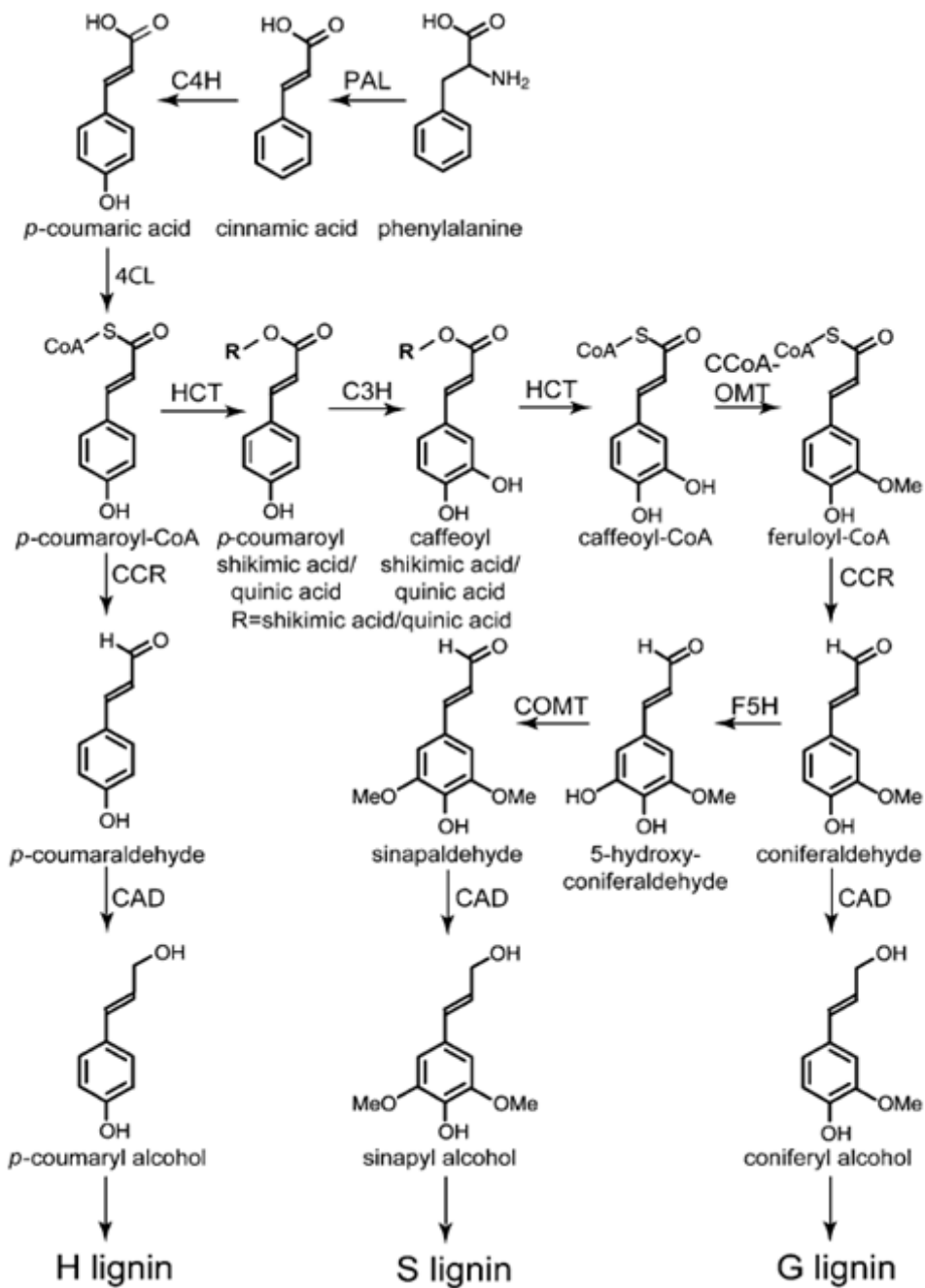
Lignifikace je nevratný proces, jehož konečným produktem je lignin. Může být součástí normálního vývoje rostliny, nebo může být indukovaná. Nejčastěji lignifikují sekundární buněčné stěny, ale lignifikovat mohou i primární stěny a střední lamely. Samotný proces lignifikace se rozděluje do tří základních kroků – biosyntéza monolignolů, doprava monolignolů k místu, kde se bude lignin ukládat a polymerizace, která vede ke konečné depozici ligninu v podobě heteropolymeru.

3.1 Syntéza monolignolů

Jak shrnuje několik recentních review, za první krok syntézy ligninu lze označit fenylypropanoidní dráhu (Boerjan a kol., 2003; Raes a kol., 2003; Vanholme a kol., 2010; Vanholme a kol., 2019; Zhao, 2016). V této dráze vznikají deriváty fenylyalaninu, který je syntetizován šikimátovou dráhou v plastidech. Na počátku tedy stojí ve většině případů fenylyalanin (u trav to může být i tyrosin) (Vanholme a kol., 2019), který je díky enzymům přeměňován až k H, G a S jednotkám ligninu. Celý proces probíhá v cytosolu rostlinné buňky za přítomnosti řady enzymů, které jsou nezbytné. Proces fenylypropanoidní dráhy, meziprodukty a enzymy jsou podrobně znázorněny na *obrázku č. 3*.

Prvním enzymem ve fenylypropanoidní dráze je PAL (fenylyalaninamoniaklyáza), který katalyzuje neoxidativní deaminaci fenylyalaninu. Při tomto procesu vzniká kyselina trans-skořicová a NH_3 (amoniak) (Jones, 1983; Whetten a Sederoff, 1995). Dalším proteinem řídícím přeměnu kyseliny trans – skořicové na kyselinu *p*-kumarovou je C4H (cinamát-4-hydroxyláza) (Mizutani a kol., 1997; Russell, 1970). Enzym C4H patří do skupiny cytochrom P450 dependentních monooxygenáz, spolu s enzymy C3H (*p*-kumarát-3-hydroxyláza) a F5H (ferulát-5-hydroxyláza), které mají ve fenylypropanoidní dráze také svou roli. Enzymy z rodiny cytochrom P450 dependentních monooxygenáz jsou membránové proteiny asociované s membránou endoplazmatického retikula, dnes dobře prozkoumané a popsané (Chapple, 1998). Dalším krokem dráhy je přeměna *p*-kumarátu na *p*-kumaryl-CoA, zprostředkovaná enzymem 4CL (4-kumarát:CoA-ligáza) (Lee a kol., 1997). Po tomto kroku se fenylypropanoidní dráha rozděluje do dvou směrů. Jeden směr vede k H jednotkám ligninu, druhý směr vede k S a G jednotkám ligninu, a bude se dělit později. Pokud se vydáme směrem k H jednotkám, následuje enzym CCR (cinnamyl-CoA-reduktáza), který mění *p*-kumaryl-CoA na *p*-kumarylaldehyd (Gross a kol., 1973). CAD (cinnamylalkoholdehydrogenáza) je posledním enzymem ve fenylypropanoidní dráze a je

nezbytná pro redukci skořicových aldehydů na příslušné alkoholy, jeho aktivitou tedy v tomto směru dráhy vzniká *p*-kumarylalkohol (Walter a kol., 1988). V případě druhého směru je *p*-kumaryl-CoA postupně přeměněn až na ferulyl-CoA, musí tedy dojít k jeho metoxylaci na uhlíku C3. Této přeměny se účastní dva enzymy, a to enzym HCT (*p*-hydroxycinnamyl-CoA:chinát/šikimát-*p*-hydroxycinnamyltransferáza) (Hoffmann a kol., 2003), patřící do skupiny acetyltransferáz a a dále již dříve uvedený enzym C3H. Enzym CCoAOMT (kafeyol-CoA-O-methyltransferáza) řídí metylaci kafeoyl-CoA na feruloyl-CoA (Ye a kol., 1994). Ferulyl-CoA je dále přeměněn na koniferylaldehyd enzymem CCR. V tomto okamžiku se dráha opět rozděluje do dvou směrů. Ve směru ke G jednotkám se zapojuje už jen enzym CAD, který v tomto případě mění koniferylaldehyd na koniferalkohol. Ve druhém směru, tedy ve směru k S jednotkám, probíhá ještě druhá metoxylace, tentokrát na uhlíku C5. Tu zajišťují dva enzymy cytochrom P450 dependentní monooxygenáza F5H a následně COMT (O-methyltransferáza) (Ye a kol., 1994). Dochází ke změně koniferylaldehydu přes 5-hydroxykoniferaldehyd na sinapylaldehyd. Posledním krokem je opět zapojení CAD a přeměna sinapylaldehydu na sinapylalkohol (Raes a kol., 2003).



Obr.3: Schéma fenylpropanoidní dráhy

Enzymy působící ve fenylpropanoidní dráze: PAL (fenylalaninamoniaklyáza), C4H (cinamát 4-hydroxyláza), 4CL (4-kumarát:CoA-ligáza), HCT (*p*-hydroxycinnamyl-CoA:chinát/šikimát-*p*-hydroxycinnamyltransferáza) CCR (cinnamyl-CoA-reduktáza), C3H (*p*-kumarát-3-hydroxyláza), CCoAOMT (kafeoyl-CoA-O-methyltransferáza), COMT (O-methyltransferáza), F5H (ferulát-5-hydroxyláza) a CAD (cinnamylalkoholdehydrogenáza).

Převzato z: Vanholme a kol. (2010)

Z experimentů na *Arabidopsis* je vyvozeno, že genů potřebných pro lignifikaci je celkem 14 a jsou to konkrétně *PAL1-4*, *C4H*, *4CL1-2*, *HCT*, *C3H1*, *CCoAOMT1*, *CCR1*, *F5H1*, *COMT* a *CAD6* (Raes a kol., 2003). Geny a následně enzymy mají ve fenylypropanoidní dráze svou (z velké části) nezastupitelnou roli, kterou můžeme prokázat pomocí transgenních rostlin = mutantů, u nichž je pomocí genetických modifikací ovlivněna exprese určitých genů. Následně můžeme sledovat změny v množství daných enzymů a dopad na proces lignifikace.

PAL geny byly u *Arabidopsis* nalezeny čtyři – *PAL1-4* (Ohl a kol., 1990). Každý z genů je během lignifikace exprimován v různém množství a mimo lignifikaci mají také jiné funkce (Olsen a kol., 2008). *PAL* geny byly prokázány i u jiných rostlinných druhů, například u rýže (Minami a kol., 1989), u *Bambusa oldhamii* (Hsieh a kol., 2011), u *Lycoris radiata* (Jiang a kol., 2011) a dalších, a nachází se u nich v různých počtech ortologů. *PAL* geny lze nalézt také u zelených řas (*Chlorophyta*), konkrétně u váleče koulivého (*Volvox*), nebo u říše hub (*Fungi*), konkrétně u *Laccaria bicolor*, zástupce rodu lakovek (Xu a kol., 2009). *PAL* geny a jejich funkce jsou intenzivně zkoumány na transgenních rostlinách. Jako příklad lze uvést práci Huang a kol. (2010) zabývající se vícenásobnými *pal* mutanty *Arabidopsis pall-pal2* a *pall-pal2-pal3-pal4*. Tito mutantů vykazují snížený obsah ligninu (především mutant ve všech čtyřech *PAL* genech), což má za následek například zhoršený růst a menší odolnost vůči vodnímu stresu. Mimo účasti *PAL* genů na lignifikaci z výsledků vyplývají i jejich další funkce. Dvojitý mutant *Arabidopsis pall-pal2* vykazuje změny v antokyanové dráze a nedochází u něj k následnému ukládání antokyanů v různých pletivech, což zhoršuje jeho ochranu proti UV záření. Je však fertilní a produkuje polyfenolický tanin, který se ukládá v semenech. Semena jsou díky taninu žlutá, což u divokých forem *Arabidopsis* není běžné. Čtyřnásobný mutant *Arabidopsis pall-pal2-pal3-pal4* vykazuje sterilitu a omezený růst. Další příklad experiment na transgenních rostlinách je uveden v práci Bate a kol. (1994) analyzující *Nicotiana tabacum* s mutacemi v genu *PAL*. Práce dokazuje, že se *PAL* enzymy stávají pro fenylypropanoidní dráhu limitujícím faktorem až v případě snížení jejich hladiny o 75-80 %. Z důsledků tedy vyvozujeme, že snížení *PAL* enzymů do určité hladiny v některých případech nemusí znamenat rozsáhlý zásah do samotné tvorby ligninu.

Pro druhý enzym fenylypropanoidní dráhy *C4H* se dříve předpokládalo pouze jeden *C4H* gen (Mizutani a kol., 1997). Pozdější analýzou byly zjištěny dvě třídy *C4H* genů, jak Nedelkina a kol. (1999) dokládají v experimentu zaměřeném na fazol obecný (*Phaseolus vulgaris*), u kterého se vyskytují obě třídy. U *Arabidopsis* se předpokládá, že II. třída *C4H* genů se během evoluce vytratila, dnes u něj figuruje pouze gen patřící do I. třídy (Raes a kol.,

2003). Sykes a kol. (2015) ve své práci na *Eucalyptus* prokazují snížený obsah ligninu při utišení exprese CH4.

Jednou z prvních prací zabývajících se genem *4CL* je práce Kuhn a kol. (1983) s petrželí zahradní (*Petroselinum hortense*), jejíž izolované buňky byly vystaveny UV záření, nebo byly ošetřeny houbovými elicitory, a následně u nich pak byla zkoumána hladina enzymu *4CL*. U *Arabidopsis* byly zjištěny čtyři *4CL* geny a devět *4CL* – like genů (Ehltling a kol., 1999). *4CL* geny se řadí do dvou tříd, *4CL1*, *4CL2* a *4CL4* tvoří jednu třídu, *4CL3* gen sám tvoří třídu druhou. *4CL* – like geny tvoří třídu samostatnou (Raes a kol., 2003). U jiných rostlinných druhů byly detekovány různé počty členů této rodiny genů. U dvou druhů topolu (*Populus euphratica*, *Populus pruinosa*) bylo zjištěno dvacet *4CL* genů, u vrby (*Salix suchowensis*) bylo nalezeno dvanáct *4CL* genů (Zhang a kol., 2015). *4CL* enzymy katalyzují více reakcí ve fenyylpropanoidní dráze (Lee a kol., 1997; Zhang a kol., 2015). V roce 1999 Hu a kol. dokázali na transgenních *Populus tremuloides*, že v případě snížení exprese genu pro enzym *4CL* dochází k snížení obsahu ligninu v rostlině. Pokud dojde ke snížení ligninu na 45% původního obsahu, *Populus tremuloides* kompenzuje tuto ztrátu 15% nárůstem obsahu celulózy (Hu a kol., 1999).

CAD genů je celkem devět, a řadí se do tří tříd – *CAD* I. třídy (*CAD2*, *CAD6*), *CAD* II. třídy (*CAD3*, *CAD4*, *CAD5*), *CAD* III. třídy (*CAD1*, *CAD7*, *CAD8*), gen *CAD9* se neřadí ani do jedné z tříd a stojí samostatně (Raes a kol., 2003). Všechny devět genů *CAD* bylo experimentálně nalezeno u *Arabidopsis*, pro lignifikaci jsou nezbytné geny *CAD* I. třídy (Sibout a kol., 2003). Z experimentů na borovici kadidlové (*Pinus taeda*) vyplývá, že pokud je enzym *CAD* v přirozené hladině, dochází k ukládání klasických ligninových monomerů. V případě snížení hladiny enzymu *CAD*, *Pinus taeda* ukládá do ligninu různorodé chemické látky. Dalším projevem je i viditelně odlišné zbarvení dřeva (MacKay a kol., 1997; Ralph a kol., 1997).

HCT gen u *Arabidopsis* také pouze jeden (Raes a kol., 2003). Práce Li a kol. (2010) dokládá nezbytnost enzymu *HCT* pro lignifikaci a správný vývoj rostliny. Mutanti s narušenou funkcí tohoto enzymu vykazují snížení celkového obsahu ligninu o 80 %, změnu poměru ligninových jednotek a zakrnělý růst. Tato práce dále dokazuje, že lze fenotyp mutantů částečně zvrátit a vykompenzovat chybějící enzym přidáním enzymu zcela jiného. Tato práce na transgenní rostlině *Arabidopsis* znázorňuje následky kompenzace chybějícího enzymu *HCT* enzymem *F5H* z vranečku, konkrétně ze *Selaginella moellendorffii*. Na obrázku č. 4 je porovnán růst *HCT*-RNAi mutantů *Arabidopsis*, u kterých byla navozena RNA

interference vůči genu *HCT*. V jednom případě byl do mutanta vnesen gen pro enzym F5H z vranečku, do druhého mutanta gen z vranečku vnesen nebyl. Z výsledků vyplývá, že mutant s vnesením F5H vykazuje rychlejší růst, zatímco mutant bez vnesení roste pomaleji a je zakrslého vzrůstu. Tento výsledek naznačuje možnou alternativu syntézy G a S podjednotek ligninu. Další zajímavostí je vnesení F5H ze *Selaginella*, tedy výrazně evolučně původnější rostliny do *Arabidopsis*.



Obr. 4: Vzhled mutantů *Arabidopsis* s navozenou interferencí vůči genu *HCT* (*tt4-2 HCT-RNAi*) bez vnesení (-SmF5H) nebo s vnesením (+SmF5H) genu kódujícího F5H enzym ze *S. moellendorffii*.

Jako kontrolní genotyp je zde linie *Arabidopsis* bez enzymu CHS (chalkonsyntázy; linie *tt4-2*), nefunkčnost tohoto enzymu se nicméně na fenotypu rostlin neprojevuje.

Převzato z: *Li a kol. 2010*

Genů *C3H* je několik, u *Arabidopsis* identifikovány tři – *C3H1-3* (Raes a kol., 2003). *CCoAOMT* genů bylo u *Arabidopsis* detekováno sedm a řadí se do dvou tříd (Raes a kol., 2003; Zhong a kol., 1998). V některých případech může mít snížení hladiny určitého enzymu negativní dopad na tvorbu ligninu, ale zvýší se produkce jiných látek, což dokazuje i práce Shaipulah a kol. (2016) popisující následky snížení exprese *CCoAOMT* u bílého kultivaru *Petunia hybrida* ‘Mitchell’. Tato práce dokazuje, že v případě snížení hladiny enzymu *CCoAOMT* dochází ke snížení celkového obsahu ligninu, ale zvýší se produkce antokyanů, a původně bíle kvetoucí kultivar *Petunia* mění zbarvení květů na světle fialové (obrázek č. 5). Lignin i antokyany jsou deriváty fenylalaninu, a začátek fenylpropanoidní dráhy pro jejich syntézu je stejný. Změna zbarvení, tedy zvýšená tvorba antokyanů a snížení obsahu ligninu

jasně dokazuje roli enzymu CCoAOMT v syntéze ligninových podjednotek (Shaipulah a kol., 2016).



Obr.5: Transgenní linie *Petunia hybrida* (line 4, vpravo) se sníženou expresí genu *CCoAOMT* vykazuje zvýšený obsah antokyanů v květu oproti divokému typu (WT vlevo).

Převzato z: Shaipulah a kol. 2016

F5H geny se v *Arabidopsis* se nachází dva – *F5H1* a *F5H2* (Raes a kol., 2003). Objevení *F5H* charakterizovalo novou skupinu CYP84, spadající do rodiny cytochrom P450 dependentních monooxygenáz (Meyer a kol., 1996). Nadměrná exprese genů *F5H* také vede k různým změnám v nově vznikajícím ligninovém polymeru (Weng a kol., 2010b). Pokud se u transgenní *Arabidopsis* sníží hladina enzymu *F5H*, který je esenciální pro tvorbu S jednotek, dochází k narušení jejich tvorby a následně i strukturním rozdílům ve vznikajícím ligninu (Chapple a kol., 1992).

U *Arabidopsis* je znám pouze jeden *COMT* gen (Raes a kol., 2003) a dva *CCR* geny, *CCR1* a *CCR2*, dále jen *CCR* – like geny (Lauvergeat a kol., 2001). Mutanty v genech *CCR* se zabývá například práce Thévenin a kol. (2011), která poukazuje na nezbytnost *CCR* enzymu nejen na lignifikaci, ale i na vývoj *Arabidopsis*.

3.2 Transport monolignolů

K tomu, aby mohl nastat proces polymerace ligninu, je nutné dopravit nově vzniklé monolignoly do místa lignifikace, tedy do buněčné stěny. Předpokládají se tři možnosti, které

jsou stále předmětem výzkumu. Jednou z možností je transport pomocí ABC transportérů (ATP-Binding Cassette). Jedná se o aktivní proces, který pro své fungování potřebuje energii z ATP (Miao a Liu, 2010). ABC transportérů v rostlinách je mnoho a mají různé funkce, přehled o nich lze nalézt v článcích Kang a kol. (2011), Theodoulou (2000) a jiné. V případě transportu monolignolů se jedná konkrétně o AtABCG29/PDR1, patřící do PDR (Pleiotropic Drug Resistance) ABCG podskupiny ABC transportérů (Alejandro a kol., 2012). AtABCG29 je lokalizován na plazmalemě a jeho funkce je svázána s transportem *p*-kumarylu. U transgenní rostliny *Arabidopsis*, mutanta *abcg29*, je vyřazena exprese genu pro tento transportér, a ve výsledném efektu obsahuje tato rostlina ve své buněčné stěně nízkou hladinu H jednotek ligninu (Alejandro a kol., 2012). Dalšími možnostmi jsou vezikulární transport a pasivní difúze. Těmto dvěma možnostem se nepřikládá takový význam, jako transportu pomocí ABC transportérů, vzhledem k tomu, že velká část zkoumání proběhla *in-vitro* (Barros a kol., 2015).

3.3 Polymerace ligninu

Po dopravení monolignolů do buněčné stěny nastává proces polymerace ligninu. Monolignoly jsou dehydrogenovány (oxidovány) na monolignolové radikály, a to za pomoci peroxidáz a lakáz (Hatfield a Vermerris, 2001; Whetten a Sederoff, 1995). V genomu *Arabidopsis* bylo nalezeno 73 genů pro peroxidázy (Valério a kol., 2004) a 17 genů pro lakázy (Turlapati a kol., 2011). Ke správnému fungování peroxidázy je zapotřebí peroxid vodíku H₂O₂ (Davin a Lewis, 2000). Jako hlavní zdroj peroxidu vodíku slouží NADPH oxidázy, které dokáží produkovat superoxidový radikál, ten je následně měněn na peroxid vodíku (Boerjan a kol., 2003; Ogawa a kol., 1997). Dalším katalyzátorem pro vznik radikálů je oxidativní enzym lakáza, který na rozdíl od peroxidázy nepotřebuje pro své fungování peroxid vodíku, ale kyslík (Ranocha a kol., 1999). Po dehydrogenaci (oxidaci) nastává spojování monolignolových radikálů do ligninového polymeru.

Monolignolové radikály jsou následně zapojovány do polymeru ligninu etherovými vazbami, nebo vazbami uhlík-uhlík (Önnerud a kol., 2002). Jednotky H, G a S se spolu párují libovolně. Radikály se připojují na nově vznikající polymer dvěma typy vazeb. Prvním typem je vazba C-C, tedy vazba uhlík – uhlík, příklady takových vazeb jsou 5-5, β-5, β-β a β-1 (β uhlíkem se rozumí uhlík v pozici C8) (Boerjan a kol., 2003). Druhým typem je éterová vazba C-O-C, v takovém případě se nový radikál připojuje svým β uhlíkem na vznikající polymer, příklady těchto vazeb jsou 5-O-4, nebo 8-O-4, jinak také β-O-4, která je vazbou nejvíce se vyskytující (Boerjan a kol., 2003). Dříve se uvažovalo o modelu náhodné vazby, ve kterém se

předpokládalo, že se jednotlivé monolignolové radikály spojují zcela náhodně a vytvářejí tak ligninový polymer. Dnes převažuje názor, že k náhodnému párování nedochází a přijímá se proteinově řízený model, kde se monolignolové radikály spojují řízeně za pomoci proteinů (Boerjan a kol., 2003). Jako tyto “řídící“ proteiny se uvažují proteiny DIR (dirigent proteins) (Davin a Lewis, 2000). Počet DIR proteinů se druhově liší, například u *Arabidopsis* bylo experimentálně zjištěno 26 DIR a DIR-like proteinů (Paniagua a kol., 2017), u hrušně (*Pyrus bretschneideri*) bylo zjištěno 89 genů pro DIR proteiny (Cheng a kol., 2018). DIR proteiny se uplatňují také při vzniku lignanů (Davin a Lewis, 2000). Lignany jsou skupina sekundárních rostlinných metabolitů, opticky aktivních dehydrodimerů monolignolů (Ayres a Loike, 1990; Saleem a kol., 2005), a právě u této skupiny byly DIR proteiny poprvé popsány (Davin a Lewis, 2000).

3.4 Regulace lignifikace

Proces lignifikace a jeho rozsah je řízen řadou faktorů, které jsou teprve objevovány. Mezi fytohormony, které stimulují lignifikaci jsou řazeny např. jasmonáty nebo ethylen (Huang a kol., 2013; Kärkönen a Koutaniemi, 2010). Dalším fytohormonem je brassinolid, který dle práce Shen a kol. (2013) indukuje lignifikaci u buněčných kultur prosa. Pozitivní regulátory lignifikace jsou např. transkripční faktory AtMYB61 (Newman a kol., 2004), AtMYB32 (Preston a kol., 2004). Dalším regulátorem je MYB103. Jak vyplývá z výsledků práce Öhman a kol. (2013), mutanti *Arabidopsis myb103* vykazují sníženou hladinu genu *F5H*. Tím pádem u nich dochází k výrazné redukci S jednotek. Redukci S jednotek tyto mutanti kompenzují nadprodukcí G jednotek. Negativním regulátorem lignifikace je např. transkripční faktor BREVIPEDCELLUS (Mele a kol., 2003).

4. MECHANISMUS LIGNIFIKACE U RŮZNÝCH TYPŮ BUNĚK

Lignin je důležitý pro funkci hned několika typů buněk. Nejen složení ligninu (jak již bylo zmíněno v předchozích kapitolách), ale také mechanismy lignifikace se mohou u jednotlivých typů buněk lišit. V následující kapitole budou popsány a porovnány mechanismy lignifikace a její funkce u vodivých pletiv, sklerenchymu a v Casparyho proučcích. Lignifikované mohou být i další rostlinné struktury (např. generativní orgány, sekreční buňky a další), které nebudou v této práci podrobněji popisovány.

4.1 Vodivá pletiva

Jak již bylo zmíněno v úvodu, vodivá pletiva zajišťují transport anorganických a organických látek po rostlinném těle (Fahn, 1990). Dalšími funkcemi jsou mechanická opora rostliny a transport signálních molekul (Fukuda, 1997). Z hlediska ligninu se tato kapitola zaměřuje na xylém, tedy na dřevní část vodivých pletiv. Xylém je tvořen cévními elementy, sklerenchymem a parenchymem.

Cévní elementy jsou tvořeny dvěma typy buněk, jak shrnuje např. Fahn (1990). Prvním typem jsou cévice neboli tracheidy, které jsou vývojově původnější a jsou tvořeny dlouhými, protáhlými buňkami. Tracheidy nalezneme především u rostlin nahosemenných a výtrusných, v některých případech se nacházejí společně s cévami u rostlin krytosemenných. Druhým typem jsou vývojově odvozenější cévy neboli tracheje. Cévy jsou tvořeny do trubice pospojovanými články cév, propojenými perforovanými koncovými stěnami. Při diferenciaci buněk dochází u obou typů k následnému sekundárnímu tloušťnutí, tedy depozice sekundární buněčné stěny, která může následně lignifikovat (Fahn, 1990). Sekundární tloušťnutí cévních elementů je nerovnoměrné z důvodů nároků kladených na cévní elementy. Cévní elementy zajišťují apoplastický vzestupný transport, tedy transport od kořenů do nadzemních částí rostliny. Stěny musí být dostatečně pevné, aby odolaly síle transpiračního sání, ale zároveň tenké pro potřebu transportu vody a minerálních látek v radiálním směru (Hacke a Sperry, 2001). Nerovnoměrné tloušťnutí, tedy proces vytváření sekundární buněčné stěny pouze v určitých částech buňky, zajišťuje kombinaci jmenovaných vlastností (Cronshaw a Bouck, 1965). Části stěn bez uložené sekundární stěny se nazývají ztenčeniny, a mohou mít různou podobu.

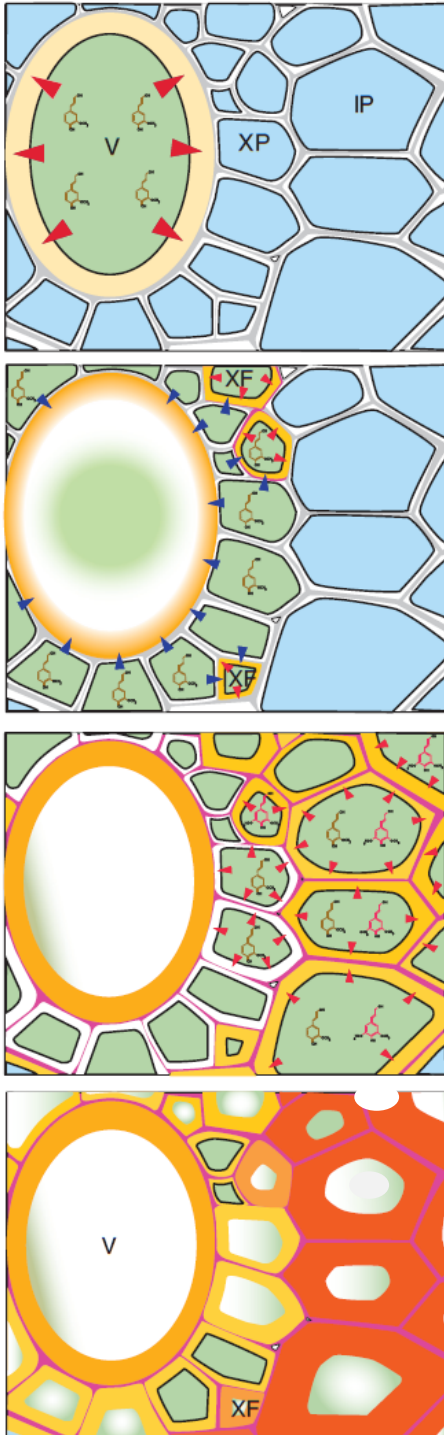
Hosokawa a kol. (2001) pojednává o tom, že lignifikace buněčných stěn cévních elementů probíhá až po programované buněčné smrti těchto buněk. Tato hypotéza předpokládá úlohu tzv. “dobrých sousedů“, tedy metabolicky aktivních parenchymatických buněk obklopujících buňky cévních elementů, u kterých zprostředkovávají lignifikaci. Tuto hypotézu potvrzují i další práce, například Pesquet a kol. (2013). Parenchymatické buňky dokáží exprimovat geny *CAD* a *CCR* (Baghdady a kol., 2006), tedy geny nezbytné pro lignifikaci (viz. kapitola 3). Práce Smith a kol. (2013) však přináší důkazy, že buňky cévních elementů mohou lignifikovat ještě před programovanou buněčnou smrtí. V první fázi probíhá autonomní lignifikace, tedy samotné živé buňky cévních elementů syntetizují monolignoly, které následně ukládají do svých buněčných stěn. Po iniciaci buněčné smrti těchto buněk nastává proces neautonomní lignifikace, kdy parenchymatické buňky obklopující cévní

elementy, tedy “dobří sousedé“ syntetizují monolignolové jednotky, které jsou následně dopravovány do stěn buněk cévních elementů. Souběžně lignifikují i sklerenchymatická vlákna, u kterých probíhá autonomní i neautonomní lignifikace opět díky parenchymatickým “dobrým sousedům“. V posledním stádiu nastává autonomní lignifikace samotných parenchymatických buněk obklopujících cévní elementy a parenchymatických buněk okolních, jak shrnuje Voxeur a kol. (2015) (obrázek č. 6). Lignifikované stěny cévních elementů obsahují hlavně G jednotky ligninu, sklerenchymatická vlákna jsou bohatá na S jednotky (Boerjan a kol., 2003; Peter a Neale, 2004). Vhodným materiálem pro výzkum xylémových buněk je ostálka sličná (*Zinnia elegans*), jejíž izolované mezofylové buňky lze aktivovat vhodnými hormony k diferenciaci na cévní elementy (Fukuda a Komamine, 1980). Na *Zinnia* v práci Pesquet a kol. (2013) byl podán důkaz o možnosti lignifikace po programované buněčné smrti. *Zinnia* a její buněčné kultury jsou vhodné nejen pro studium lignifikace, nebo diferenciaci buněk, ale také pro studium mikrotubulů (Roberts a kol., 2004).

Lignifikace v xylému *Arabidopsis* je úzce spjata s tvorbou sekundární buněčné stěny. Celý proces je řízen následujícími transkripčními faktory. Transkripčními faktory, které stimulují ukládání sekundární stěny v různých typech buněk jsou: SND1/NST3 (Secondary Wall-Associated Nac Domain Protein1/ Nac Secondary Wall Thickening Promoting Factor3), NST1 a VND6, 7 (Vascular Related Nac Domain Tf6, 7) (Růžička a kol., 2015; Zhong a kol., 2008), z nichž jsou ve vývoji xylémových elementů zapojeny především poslední jmenované VND6 a VND7 (Kubo a kol., 2005). Pro lignifikaci cévních elementů, ale i sklerenchymatických vláken xylému jsou dále klíčové transkripční faktory MYB46 a 83, které ovlivňují MYB58, 63, 85 a 103 (McCarthy a kol., 2009; Zhong a kol., 2007).

Při lignifikaci hrají klíčovou roli lakázy LAC4, LAC11 a LAC17, které oxidují monolignoly (Turlapati a kol., 2011; Zhao a kol., 2013). Z výsledků práce Zhao a kol. (2013), zaměřené na mutanty *Arabidopsis* vyplývá, že u mutanta *lac11* se míra lignifikace nemění, zatímco u dvojitých mutantů *lac11 lac4* a *lac11 lac17* se vyskytuje mírně snížená. Trojitý mutant *lac11 lac4 lac17* vykazuje rozsáhlé deformace, a to hlavně kvůli neschopnosti lignifikace cévních elementů a toxicitě nezpracovaných monolignolových radikálů. Lignifikace u tohoto mutanta však není pozastavena v Casparyho prouzcích, kde klíčovou roli v oxidaci monolignolů sehrávají peroxidázy (Zhao a kol., 2013). Po oxidaci monolignolů následuje spojování radikálů do konečné podoby ligninového polymeru.

Mnoho prací dokazuje, že omezení nebo zastavení lignifikace tracheálních elementů způsobuje u rostlin rozsáhlé změny, a může vést k silné inhibici růstu. Mezi tyto práce patří například studie Thévenin a kol. (2011), Jones a kol. (2001), Zhao a kol. (2013).



Obr. 6: V prvních fázích lignifikuje pouze céva (V) autonomní lignifikací, xylémový parenchym (XP) a okolní parenchym (IP) nelignifikují. V další fázi xylémový parenchym zprostředkovává neautonomní lignifikaci cévě s již započatou buněčnou smrtí a sklerenchymatickým vláknům (XF), u kterých však probíhá také autonomní lignifikace. V následující fázi je céva zcela lignifikovaná, probíhá pouze autonomní lignifikace xylémového parenchymu, sklerenchymatických vláken a okolního parenchymu. V poslední fázi jsou všechny buňky lignifikované.

Převzato a upraveno z: (Voxeur a kol., 2015)

4.2 Sklerenchym

Sklerenchymatické buňky slouží jako mechanická opora v pletivech základních, vodivých a krycích. Sklerenchym se nejčastěji vyskytuje ve formě sklerenchymatických vláken nebo sklereid. Sklerenchymatická vlákna tvoří protáhlé, na obou koncích zašpičatělé buňky. Sklereidy mohou být v různých formách, například jako idioblasty, shluky nebo vrstvy buněk, ale existuje mnoho přechodných forem (Fahn, 1990). Sklerenchym má význam v různých rostlinných orgánech – vodivých pletivech (Bailey, 1953), v kořenové hypodermis (Enstone a kol., 2003), v plodech (např. *Pyrus communis*) (Staritsky, 1969), v semenech (např. *Phaseolus vulgaris*), listech (např. *Fibrurea*) (Wilkinson, 1986) a dalších. Sekundární buněčné stěny sklerenchymu jsou velmi často lignifikované, ale nemusí tomu tak být vždy. Sekundární buněčná stěna se ukládá (na rozdíl od cévních elementů) na většině vnitřního povrchu primární buněčné stěny, avšak i zde se vyskytují jednoduché ztenčeniny (Fahn, 1990).

U buněk sklerenchymu probíhá především autonomní lignifikace. Sklerenchymatická vlákna, která lignifikují v xylému, využívají částečně i neautonomní lignifikace, a to díky okolním parenchymatickým “dobrým sousedům“. Buňky lignifikují ve fázi živého protoplastu, programovaná buněčná smrt nastává až po úplné lignifikaci nebo může protoplast zůstat živý (Vallet a kol., 1996). Sklerenchymatický lignin se skládá hlavně z S jednotek (Peter a Neale, 2004). V některých případech, např. právě v xylému, pokud se sklerenchymatické buňky nacházejí poblíž parenchymatických “dobrých sousedů“, obsahují i podíl G jednotek, což je chápáno jako důkaz pro hypotézu jejich částečně neautonomní lignifikace (Voxeur a kol., 2015).

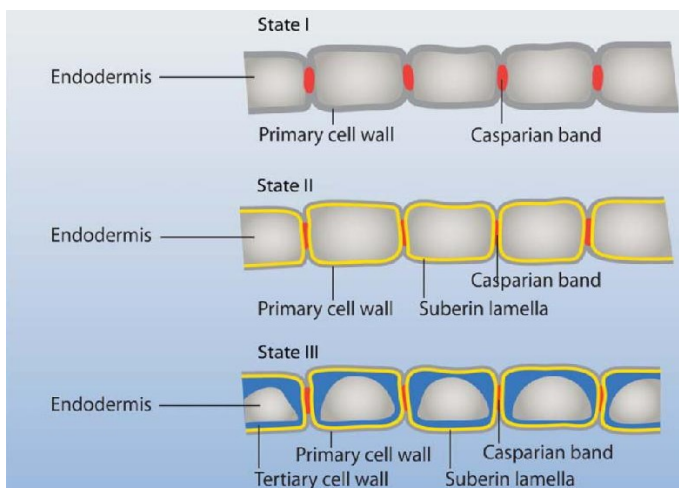
4.3 Casparyho proužky

CP jsou ligninem, případně i suberinem impregnované oblasti buněčné stěny (Naseer a kol., 2012; Zeier a Schreiber, 1997), které se vyskytují v radiálních a transversálních stěnách buněk endodermis (obrázek č. 7), kde za normálních podmínek zabírají 1/3–1/2 délky těchto stěn (Enstone a kol., 2003). Endodermis je tvořena živými buňkami jednotného tvaru, které k sobě natěsno přiléhají tak, že mezi sebou nemají mezibuněčný prostor. Endodermis s CP se vyskytuje u všech cévnatých rostlin (Clarkson a Robards, 1975), výjimku tvoří skupina plavuní (*Lycopodiophyta*) (Damus a kol., 1997). Profesor Robert Caspary již v roce 1865 popsal endodermis s CP, a nazval ji “Schuttscheide“ (Caspary, 1865), v českém překladu “ochranný obal“. CP se mohou nacházet i v exodermis. Exodermis s CP nemají všechny

rostliny, některé rostliny ji nevytvářejí vůbec (Perumalla a kol., 1990; Peterson a Perumalla, 1990), jiné pouze v reakci na nepříznivé podmínky (Reinhardt a Rost, 1995). Relativně hojně se exodermis s CP vyskytuje u rostlin krytosemenných (Perumalla a kol., 1990; Peterson a Perumalla, 1990).

CP tvoří apoplastickou bariéru. Z práce De Lavisson (1910) vyplývá, že CP v endodermis jsou efektivní bariérou pro apoplastický tok z primární kůry do středního válce (De Lavisson, 1910). Toto tvrzení je všeobecně přijímáno a potvrzeno pozdějšími výzkumy. Díky CP musí všechny látky přejít z apoplastického toku do toku symplastického, tj. musí projít protoplastem buňky. Dochází tedy k selekci látek procházejících do středního válce a následně do nadzemní části rostliny (Perumalla a Peterson, 1986; Naseer a kol., 2012). Tímto způsobem se může rostlina bránit proti nežádoucím látkám, například těžkým kovům, dále také toxickým látkám nebo mikroorganismům. Mimo zabránění volnému průchodu iontů endodermální buňky s CP zabraňují zpětnému toku iontů ze středního válce do primární kůry. Tento jev je důležitý v momentě, kdy rostlina netranspiruje a mohlo by docházet k odplavování iontů zpět do půdy (mimo rostlinu) (Enstone a kol., 2003). Pokud rostlina tvoří exodermis s CP, slouží také jako apoplastická bariéra. Hlavní funkcí je zabraňování volnému průchodu iontů (stejně jako endodermis).

Dalšími modifikacemi buněčné stěny endodermálních či exodermálních buněk, které posilují funkci apoplastické bariéry, jsou suberinové lamely a sekundární buněčné stěny do podoby U-ztlustlin (*obrázek č.7*), jejichž tvorba závisí na druhu rostliny. Hlavní složkou suberinové lamely je hydrofobní látka suberin (Zeier a kol., 1999). Sekundární buněčné stěny mají větší podíl celulózy a menší podíl pektinů oproti primární stěně, a často u nich dochází k následnému ukládání ligninu.



Obr. 7: Ilustrace tří modifikací buněčné stěny v endodermis vedoucí ke zcela diferenciované apoplastické bariéře.

1. Uložení CP (state I)
2. Uložení suberinové lamely (state II)
3. Depozice sekundárních stěny do podoby U-ztlustlin (state III)

Převzato z: Schreiber a Franke (2011)

Sekundární stěny mají význam hlavně u rostlin jednoděložných, zatímco u dvouděložných se téměř nevytváří. Suberin se v těchto stěnách nevyskytuje (Zeier a Schreiber, 1998).

Vznik CP je příkladem velmi specifické lignifikace, a to pouze částí buněčných stěn endodermis či exodermis. V této kapitole je představen mechanismus lignifikace u endodermis, konkrétně u rostliny *Arabidopsis thaliana*. Mechanismus lignifikace v exodermis není zcela pochopen a je třeba dalších výzkumů.

Jedním z důležitých faktorů při tvorbě CP je transkripční faktor MYB36 (Kamiya a kol., 2015; Liberman a kol., 2015). Tento faktor je exprimován v elongační a diferenciací zóně buněk endodermis a bez něj by nemohlo dojít ke správnému uložení ligninu. MYB36 stimuluje expresi genů pro membránové proteiny z rodiny CASPs (Casparian Strip Membrane Domain Proteins), dále také geny pro PER64 (Peroxidáza 64) (Lee a kol., 2013) a ESB1 (Enhanced suberin 1) (Geldner 2013).

U *Arabidopsis* patří do rodiny CASP proteiny CASP1-5, které mají 4 trans membránové domény (Roppolo a kol., 2011). Experimentálně byla dokázána lokalizace CASP1 na místě CP, a to díky translační fúzi – označení zeleným fluorescenčním proteinem GFP (Alassimone a kol., 2012). Na počátku je CASP1 lokalizovaný difúzně, tj. v celé plasmatické membráně, později se začne formovat do ostrůvků v linii = do “korálků na šňůrce“, a později do formy pásku v té části plasmatické membrány, nad kterou dochází k depozici ligninu do buněčné stěny a vzniku CP (Hosmani a kol., 2013). Na správné místo jsou dopraveny sekreční drahou pomocí komplexu exocyst. Význam tohoto komplexu, konkrétně jeho podjednotky EXO70A1, dokládá výrazná delokalizace CASPs, kterou můžeme pozorovat u mutanta *exo70a1/lotr2* (*lordofthering2*) (Kalmbach a kol., 2017). Delokalizaci vykazuje i mutant *lotr1* (*lordofthering1*), zde však zatím není jasný mechanismus, gen *LOTR1* je navíc exprimován v celé rostlině (Li a kol., 2017). CASPs dávají vzniknout tzv. lešení pro CP – membránové doméně CSD (Casparian strip membrane domain). Zde následně vzniká silná asociace mezi cytoplasmatickou membránou a buněčnou stěnou (Roppolo a kol., 2011), kterou můžeme prokázat vystavením rostlinné buňky hypertonickému roztoku – dojde tak k plazmolýze a cytoplasmatická membrána se oddělí od buněčné stěny, pouze v místech CP k odtržení nedojde (Geldner, 2013). CASP proteiny nejsou zodpovědné za syntézu nebo polymerizaci ligninu, ale jsou nezbytné pro tvoření membránové domény CSD, nad kterou se může začít ukládat lignin a tvořit se CP (Roppolo a kol., 2011).

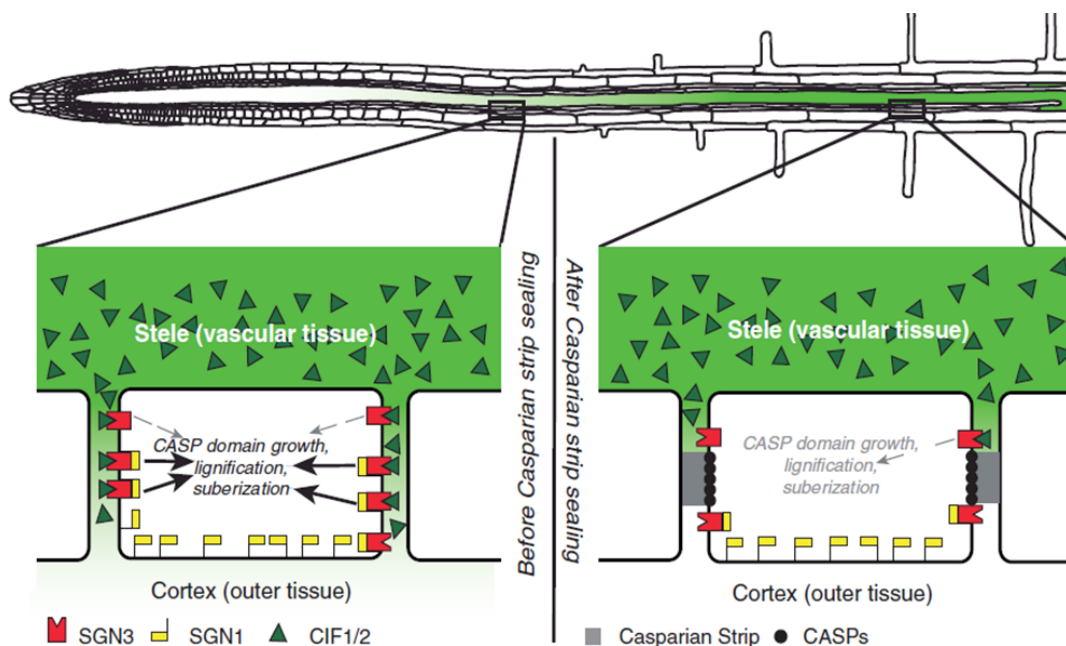
Klíčovou reakcí pro polymerizaci ligninu je oxidace monolignolů, při které vznikají radikály, které spolu polymerují. K celé reakci je zapotřebí katalýza peroxidázou, která vyžaduje peroxid vodíku H_2O_2 . Jako zdroj slouží NADPH oxidázy produkující superoxidový radikál, který je následně měněn na peroxid vodíku H_2O_2 . V případě CP je klíčová NADPH oxidáza SGN4/RBOHF (Schengen4/Respiratory Burst Oxidase Homolog F) (Lee a kol., 2013), pokud by byla činnost této oxidázy přerušena, nedošlo by k vytvoření CP vůbec. Specifickou peroxidázou pro CP je PER64 (Lee a kol. 2013). Experimentálně se zjišťovaly i funkce dalších peroxidáz – PER03, PER09, PER39, PER72, které jsou stejně jako PER64 exprimovány v endodermis, ale dosud nebyla jejich účast na procesu lignifikace prokázána. PER64 je velmi úzce spojena s CASP1, a to již ve fázi “korálek na šňůrce“, což bylo dokázáno experimentálně pomocí fluorescenčního značení – PER64 pomocí mCherry a CASP1 pomocí GFP. Pokud tuto peroxidázu vyřadíme z provozu, dojde k výraznému zpomalení tvorby CP. Po přeměně superoxidu na peroxid vodíku H_2O_2 , může začít polymerizace ligninu (Lee a kol., 2013).

Dalším důležitým proteinem je řídicí protein ESB1 z rodiny dirigent proteinů DIR (Baxter a kol., 2009). Je lokalizován ve stejném místě jako CP a je během tvorby ligninu zodpovědný za správné uspořádání monolignolových vazeb. Lokalizace ESB1 je podobná lokalizaci CASP1, tedy nejprve se vyskytuje ve formě ostrůvků v linii, a později se mění do pásku. Jeho správná lokalizace je závislá na CASP proteinech. Správná lokalizace CASP je naopak závislá na ESB1 – jedná se o vzájemnou interakci mezi těmito proteiny (Geldner, 2013). Pokud je ESB1 vyřazen z funkce, CASP proteiny nejsou lokalizovány správně, ukládání ligninu je neuspořádané a CP neúplné. V takovém případě rostlina tento nedostatek kompenzuje ukládáním velkého množství suberinu, ale nedocílí tím takové efektivity apoplastické bariéry, což se projevuje změnami v efektivitě příjmu některých minerálních živin (Baxter a kol., 2009).

V *Arabidopsis* je pro správnou lokalizaci CASP proteinů zapotřebí LRR-RLK kináza (leucin-rich-repeat receptor-like kinase) SGN3. Gen *SGN3* je exprimován v endodermálních buňkách (Pfister a kol., 2014). S touto kinázou interagují nedávno popsané peptidové ligandy specifické pro endodermis - CIF1 a CIF2 (Casparian integrity factor 1 a Casparian integrity factor 2) syntetizované ve středním válci (Nakayama a kol., 2017). Při cestě za SGN3 jsou sulfatovány pomocí enzymu TPST/SGN2 (Tyrosyl Protein Sulfotranferaze/Schengen2). Po interakci s CIF1, 2 přenáší aktivovaná SGN3 signál na kinázu SGN1 (Schengen1). Tato kaskáda CIF-SGN3-SGN1 vede k ukládání ligninu a vytvoření CP (obrázek č. 8) (Doblas a

kol., 2017). Při vyřazení CIF u mutanta *cif2*, nebo u dvojitého mutanta *cif1 cif2* dochází k narušení formy CP, při následném dodání CIF hormonů dochází k regeneraci CP (Nakayama a kol., 2017). Z toho vyplývá, že CIF1, 2 jsou nezbytné nejen pro tvorbu CP, ale také k jejich následnému fungování (Doblas a kol., 2017).

Co se týče detailnějšího popisu samotné lignifikace, bude potřeba více výzkumů. V současné době se experimenty zaměřují na přenašeče (transportéry) monolignolů potřebných pro proces lignifikace. Dosud je nám znám jen jediný přenašeč – *AtABCG29* spjat s *p*-kumaryl alkoholem, který však není specifický pro endodermis (Alejandro a kol., 2012).



Obr.8: Schéma kaskády CIF-SGN3-SGN1 u *Arabidopsis*. Mobilní peptidy CIF1 a CIF2 (zelené trojúhelníky) se pohybují ze stéle apoplastem do primární kůry až k receptorové kináze SGN3 (červené obdélníky) lokalizované na membráně endodermálních buněk, která dále interaguje s kinázou SGN1 (žluté obdélníky), což je nezbytné pro lignifikaci CP. Následně dochází k utváření formací CASP proteinů (černé tečky) v oblasti membránové domény CP a vytvoření CP (šedé pruhy).

Převzato z: Doblas a kol. (2017)

5. INDUKOVANÁ LIGNIFIKACE

Lignin je důležitou součástí souboru odpovědí rostliny na nepříznivé podmínky okolního prostředí. Jak dokazuje mnoho prací a shrnuje např. (Barros a kol., 2015), zvýšená exprese

genů pro lignifikaci může být vyvolána různými stresovými faktory, jakými jsou například poranění rostlinného orgánu, napadení rostliny patogeny, vodní stres, nadměrné UV záření, nízká teplota, a další. Odpovědí na stresové podmínky však není pouze lignin. Důležitou roli hrají také flavonoidy a fytoalexiny (Deverall, 1989) vznikající (stejně jako lignin) fenyylpropanoidní drahou. Je známo, že lignin ukládaný se během indukované lignifikace do primárních stěn, do kterých se za normálních podmínek neukládá, se od ligninu ukládaného přirozeně do stěn sekundárních liší strukturou (Lange a kol., 1995). Molekulární mechanismy indukované lignifikace však nejsou dosud plně vyjasněny, i když novější práce, jak shrnuje Cesarino (2019), se o to pokoušejí. Lignin je ukládán v různém množství a složení v závislosti na rostlinném druhu, a také na míře a druhu stresového faktoru, případně i kombinací více faktorů. Vzhledem k možnosti simulace stresových faktorů lze indukovanou lignifikaci dobře pozorovat v laboratorních podmínkách.

Jednou z možností simulace je mechanické poranění rostliny. Jako příklad takového experimentu lze uvést práci Rittinger a kol. (1987), která dokládá fakt, že rostlina ukládá lignin během poranění v různém rozsahu v závislosti na rostlinném druhu a poraněném orgánu. Delessert a kol. (2004) se ve své práci zabývají ukládáním ligninu v případě poranění *Arabidopsis*. Stresovým faktorem mohou být infekce různými patogeny, například houbovými. Za normálních podmínek se pšenice setá (*Triticum aestiva*) dokáže díky indukované lignifikaci dobře vypořádat s napadením rzí travní (*Puccinia graminis*). V experimentu Moerschbacher a kol. (1990) byla u pšenice infikované rzí záměrně utišena exprese *PAL* genu nezbytného pro syntézu ligninu. Infekce je v takovém případě o mnoho rozsáhlejší, což opět dokazuje významnost indukované lignifikace. Dalším stresovým faktorem může být nedostatek vody, tedy vodní stres. Výsledky práce Yoshimura a kol. (2008), která se zabývá následky vodního stresu na melounu (*Citrullus lanatus*), ukazují na zvýšení obsahu ligninu u stresované rostliny. Z výsledků dále vyplývá překvapivá skutečnost, že nárůst obsahu ligninu je nejvyšší až v posledních stádiích stresované rostliny. Příčina tohoto jevu je dosud neznámá. Indukovaná lignifikace však nemusí být nutně jen odpověď na akutní stresové faktory. Cipollini (1997) během svého experimentu exponoval rostliny fazolu uměle generovanému proudu vzduchu v určitých periodách. Z výsledného měření vyplývá, že rostliny ukládaly více ligninu, což jasně ukazuje na indukci ligninu i v případě potřeby mechanické podpory, nejen jako odpověď na akutní infekci, nebo poranění.

6. ZÁVĚR

Lignin je velmi rozmanitý polymer tvořící neodmyslitelnou součást všech cévnatých rostlin, zejména pro své jedinečné vlastnosti. Je tedy esenciální pro růst a vývoj rostlin. Nedávno vyšel najevo překvapivý fakt o přítomnosti ligninu také u rostlin bezcévných. Struktura ligninu u cévnatých rostlin je známa již delší dobu, avšak podrobnější mechanismy lignifikace, tedy syntézy monolignolů, jejich transportu k místu lignifikace a samotné polymerace ligninu zatím nejsou zcela objasněny. V posledních letech, hlavně díky rozkvětu molekulární biologie jsou postupně objevovány další geny a enzymy účastníci se lignifikace, díky čemuž začínají být mechanismy lignifikace jasnější. Jako modelové organismy jsou nejvíce využívány huseníček (*Arabidopsis*) a ostálka (*Zinnia*). Lignifikace jako odpověď na nepříznivé podmínky je také intenzivně zkoumána, ale přestože existuje velké množství prací, které tento fenomén popisují, podrobnější mechanismy nejsou zcela známy. Dle četnosti recentnějších výzkumů soudím, že brzy dojde k lepšímu objasnění tohoto jevu. V poslední době se výzkumu ligninu a procesu lignifikace věnují také studie související se zpracováním dřeva v dřevařském průmyslu. Výzkumy v dřevařském průmyslu pohlížejí na lignin jako “nežádoucí” látku a zaměřují se na jeho degradaci.

7. SEZNAM LITERATURY

- Alassimone, J., Roppolo, D., Geldner, N., & Vermeer, J. E. M. (2012). The endodermis-development and differentiation of the plant's inner skin. *Protoplasma*, 249(3), 433–443.
- Alejandro, S., Lee, Y., Tohge, T., Sudre, D., Osorio, S., Park, J., ... Martinoia, E. (2012). AtABCG29 is a monolignol transporter involved in lignin biosynthesis. *Current Biology*, 22(13), 1207–1212.
- Ayres, D. C., & Loike, J. D. (1990). *Lignans - Chemical, biological and clinical properties*. Cambridge University Press.
- Baghdady, A., Blervacq, A. S., Jouanin, L., Grima-Pettenati, J., Sivadon, P., & Hawkins, S. (2006). Eucalyptus gunnii CCR and CAD2 promoters are active in lignifying cells during primary and secondary xylem formation in Arabidopsis thaliana. *Plant Physiology and Biochemistry*, 44(11–12), 674–683.
- Bailey, I. W. (1953). Evolution of the tracheary tissue of land plants. *American Journal of Botany*, 40(1), 4–8.
- Barros, J., Serk, H., Granlund, I., & Pesquet, E. (2015). The cell biology of lignification in higher plants. *Annals of Botany*, 115(7), 1053–1074.
- Basile, A., Giordano, S., López-Sáez, J. A., & Cobianchi, R. C. (1999). Antibacterial activity of pure flavonoids isolated from mosses. *Phytochemistry*, 52(8), 1479–1482.
- Bate, N. J., Orr, J., Ni, W., Meromi, A., Nadler-Hassar, T., Doerner, P. W., ... Elkind, Y. (1994). Quantitative relationship between phenylalanine ammonia-lyase levels and phenylpropanoid accumulation in transgenic tobacco identifies a rate-determining step in natural product synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(16), 7608–7612.
- Baxter, I., Lahner, B., Schreiber, L., Mickelbart, M. V., Rus, A., Muthukumar, B., ... Franke, R. B. (2009). Root suberin forms an extracellular barrier that affects water relations and mineral nutrition in Arabidopsis. *PLoS Genetics*, 5(5), 1–12.
- Boerjan, W., Ralph, J., & Baucher, M. (2003). Lignin biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology*, 54(1), 519–546.
- Boyce, C. K., Zwieniecki, M. A., Cody, G. D., Jacobsen, C., Wirick, S., Knoll, A. H., & Holbrook, N. M. (2004). Evolution of xylem lignification and hydrogel transport regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(50), 17555–17558.
- Brauns, F. E. (1952). *The chemistry of lignin*. Vídeň: Academic Press.
- Campbell, M. M., & Sederoff, R. R. (1996). Variation in lignin content and composition (Mechanisms of control and implications for the genetic improvement of plants). *Plant Physiology*, 110(1), 3–13.
- Casparry, R. (1865). Bemerkungen über die Schutzscheide und die Bildung des Stammes und der Wurzel. *Jahrbücher Für Wissenschaftliche Botanik*, 4, 101–124.
- Cesarino, I. (2019). Structural features and regulation of lignin deposited upon biotic and abiotic stresses. *Current Opinion in Biotechnology*, 56, 209–214.
- Cipollini Jr., D. F. (1997). Wind-induced mechanical stimulation increases pest resistance in common bean. *Oecologia*, 111(1), 84–90.
- Clarkson, D. T., & Robards, A. W. (1975). Endodermis, its structural development and physiological role. *Development and Function of Roots Cabot Symposium*.

- Creighton, R. H. J., Gibbs, R. D., & Hibbert, H. (1944). Studies on lignin and related compounds. LXXV. Alkaline nitrobenzene oxidation of plant materials and application to taxonomic classification. *Journal of the American Chemical Society*, 66(1), 32–37.
- Cronshaw, J., & Bouck, B. (1965). The fine structure of differentiating xylem elements. *The Journal of Cell Biology*, 24(3), 415–431.
- Cullmann, F., & Becker, H. (1999). Lignans from the liverwort *Lepicolea ochroleuca*. *Phytochemistry*, 52(8), 1651–1656.
- Damus, M., Peterson, R. L., Enstone, D. E., & Peterson, C. A. (1997). Modifications of cortical cell walls in roots of seedless vascular plants. *Botanica Acta*, 110(2), 190–195.
- Davin, L. B., & Lewis, N. G. (2000). Dirigent proteins and dirigent sites explain the mystery of specificity of radical precursor coupling in lignan and lignin biosynthesis. *Plant Physiology*, 123(2), 453–462. <https://doi.org/10.1104/pp.123.2.453>
- Davin, L. B., & Lewis, N. G. (2005). Lignin primary structures and dirigent sites. *Current Opinion in Biotechnology*, 16(4), 407–415. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2005.06.011>
- De Lavison, J. de R. (1910). Du mode de pénétration de quelques sels dans la plante vivante: Rôle de l'endoderme. *Revue Générale De Botanique*, 22, 225–240.
- De Vries, J., & Archibald, J. M. (2018). Plant evolution: landmarks on the path to terrestrial life. *New Phytologist*, 217(4), 1428–1434.
- Delessert, C., Wilson, L. W., Van Der Straeten, D., Dennis, E. S., & Dolferus, R. (2004). Spatial and temporal analysis of the local response to wounding in *Arabidopsis* leaves. *Plant Molecular Biology*, 55(2), 165–181.
- Deverall, B. J. (1989). Tansley Review No. 18 Mechanisms of resistance and pathogenic specialization in rust-wheat interactions. *New Phytologist*, 113(3), 233–244.
- Doblas, V. G., Smakowska-Luzan, E., Fujita, S., Alassimone, J., Barberon, M., Madalinski, M., ... Geldner, N. (2017). Root diffusion barrier control by a vasculature-derived peptide binding to the SGN3 receptor. *Science*, 355(6322), 280–284.
- Donaldson, L. A. (1994). Mechanical constraints on lignin deposition during lignification. *Wood Science and Technology*, 28(2), 111–118.
- Ehltling, J., Büttner, D., Wang, Q., Douglas, C. J., Somssich, I. E., & Kombrink, E. (1999). Three 4-coumarate:coenzyme A ligases in *Arabidopsis thaliana* represent two evolutionarily divergent classes in angiosperms. *Plant Journal*, 19(1), 9–20.
- Enstone, D. E., & Peterson, C. A. (1997). Suberin deposition and band plasmolysis in the corn (*Zea mays* L.) root exodermis. *Canadian Journal of Botany*, 75(7), 1188–1199.
- Enstone, D. E., Peterson, C. A., & Ma, F. (2003). Root endodermis and exodermis: Structure, function, and responses to the environment. *Journal of Plant Growth Regulation*, 21(4), 335–351.
- Fahn, K. (1990). *PLANT ANATOMY*. Oxford: Pergamon Press.
- Fukuda, H. (1997). Tracheary element differentiation. *The Plant Cell*, 9(7), 1147–1156.
- Fukuda, H., & Komamine, A. (1980). Direct evidence for cytodifferentiation to tracheary elements without intervening mitosis in a culture of single cells isolated from the mesophyll of *Zinnia elegans*. *Plant Physiology*, 65(1), 61–64.
- Geldner, N. (2013). The endodermis. *Annual Review of Plant Biology*, 64(1), 531–558.

- Gross, G. G., Stöckigt, J., Mansell, R. L., & Zenk, M. H. (1973). Tree novel enzymes involved in the reduction of ferulic acid to coniferyl alcohol in higher plant: ferulate:CoA ligase, feruloyl-CoA reductase and coniferyl alcohol oxidoreductase. *FEBS Letters*, 31(3), 283–286.
- Hacke, U. G., & Sperry, J. S. (2001). Functional and ecological xylem anatomy. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 4(2), 97–115.
- Hatfield, R., & Vermerris, W. (2001). Lignin formation in plants. The dilemma of linkage specificity. *Plant Physiology*, 126(4), 1351–1357.
- Hoffmann, L., Maury, S., Martz, F., Geoffroy, P., & Legrand, M. (2003). Purification, cloning, and properties of an acyltransferase controlling shikimate and quinate ester intermediates in phenylpropanoid metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, 278(1), 95–103.
- Hosmani, P. S., Kamiya, T., Danku, J. M. C., Naseer, S., Geldner, N., Guerinot, M. Lou, & Salt, D. E. (2013). Dirigent domain-containing protein is part of the machinery required for formation of the lignin-based Casparian strip in the root. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(35), 14498–14503.
- Hosokawa, M., Suzuki, S., Umezawa, T., & Sato, Y. (2001). Progress of lignification mediated by intercellular transportation of monolignols during tracheary element differentiation of isolated *Zinnia mesophyll* cells. *Plant and Cell Physiology*, 42(9), 959–968.
- Hsieh, L. S., Hsieh, Y. L., Yeh, C. S., Cheng, C. Y., Yang, C. C., & Lee, P. Du. (2011). Molecular characterization of a phenylalanine ammonia-lyase gene (BoPAL1) from *Bambusa oldhamii*. *Molecular Biology Reports*, 38(1), 283–290.
- Hu, W.-J., Harding, S. A., Lung, J., Popko, J. L., Ralph, J., Stokke, D. D., ... Chiang, V. L. (1999). Repression of lignin biosynthesis promotes cellulose accumulation and growth in transgenic trees. *Nature Biotechnology*, 17(8), 808–812.
- Huang, J., Gu, M., Lai, Z., Fan, B., Shi, K., Zhou, Y.-H., ... Chen, Z. (2010). Functional analysis of the Arabidopsis PAL gene family in plant growth, development, and response to environmental stress. *Plant Physiology*, 153(4), 1526–1538.
- Huang, W. N., Liu, H. K., Zhang, H. H., Chen, Z., Guo, Y. D., & Kang, Y. F. (2013). Ethylene-induced changes in lignification and cell wall-degrading enzymes in the roots of mungbean (*Vigna radiata*) sprouts. *Plant Physiology and Biochemistry*, 73, 412–419.
- Chapple, C. (1998). Molecular-genetic analysis of plant cytochrome P450-dependent monooxygenases. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49(1), 311–343. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.49.1.311>
- Chapple, C. C. S., Vogt, T., Ellis, B. E., & Somerville, C. R. (1992). An Arabidopsis mutant defective in the general phenylpropanoid pathway. *The Plant Cell*, 4(11), 1413–1424.
- Chen, F., Tobimatsu, Y., Havkin-Frenkel, D., Dixon, R. A., & Ralph, J. (2012). A polymer of caffeyl alcohol in plant seeds. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(5), 1772–1777.
- Cheng, X., Su, X., Muhammad, A., Li, M., Zhang, J., Sun, Y., ... Lin, Y. (2018). Molecular characterization, evolution, and expression profiling of the Dirigent (DIR) family genes in chinese white pear (*Pyrus bretschneideri*). *Frontiers in Genetics*, 9(136), 1–15.
- Jiang, Y., Xia, N., Li, X., Shen, W., Liang, L., Wang, C., ... Xia, B. (2011). Molecular cloning and characterization of a phenylalanine ammonia-lyase gene (LrPAL) from *Lycoris radiata*. *Molecular Biology Reports*, 38(3), 1935–1940.
- Jin, Z., Matsumoto, Y., Tange, T., Akiyama, T., Higuchi, M., Ishii, T., & Iiyama, K. (2005). Proof of the presence of guaiacyl–syringyl lignin in *Selaginella tamariscina*. *Journal of Wood Science*, 51(4), 424–426.

- Jones, D. H. (1983). Phenylalanine ammonia-lyase: Regulation of its induction, and its role in plant development. *Phytochemistry*, 23(7), 1349–1359.
- Jones, L., Ennos, A. R., & Turner, S. R. (2001). Cloning and characterization of irregular xylem4 (irx4): A severely lignin-deficient mutant of Arabidopsis. *Plant Journal*, 26(2), 205–216.
- Kalmbach, L., Hématy, K., De Bellis, D., Barberon, M., Fujita, S., Ursache, R., ... Geldner, N. (2017). Transient cell-specific EXO70A1 activity in the CASP domain and Casparian strip localization. *Nature Plants*, 3(5), 1–9.
- Kamiya, T., Borghi, M., Wang, P., Danku, J. M. C., Kalmbach, L., Hosmani, P. S., ... Salt, D. E. (2015). The MYB36 transcription factor orchestrates Casparian strip formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(33), 10533–10538.
- Kang, J., Park, J., Choi, H., Burla, B., Kretschmar, T., Lee, Y., & Martinoia, E. (2011). Plant ABC transporters. *The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists*, 9.
- Kärkönen, A., & Koutaniemi, S. (2010). Lignin biosynthesis studies in plant tissue cultures. *Journal of Integrative Plant Biology*, 52(2), 176–185.
- Kenrick, P., & Crane, P. R. (1997). The origin and early evolution of plants on land. *Nature*, 389(6646), 33–39.
- Kubo, M., Udagawa, M., Nishikubo, N., Horiguchi, G., Yamaguchi, M., Ito, J., ... Demura, T. (2005). Transcription switches for protoxylem and metaxylem vessel formation. *Genes & Development*, 19(16), 1855–1860.
- Kuhn, D. N., Chappell, J., Boudet, A., & Hahlbrock, K. (1983). Induction of phenylalanine ammonia-lyase and 4-coumarate:CoA ligase mRNAs in cultured plant cells by UV light or fungal elicitor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81(4), 1102–1106.
- Kumar, M., Campbell, L., & Turner, S. (2016). Secondary cell walls: Biosynthesis and manipulation. *Journal of Experimental Botany*, 67(2), 515–531.
- Lange, B. M., Lapierre, C., & Sandermann Jr, H. (1995). Elicitor-induced Spruce stress lignin (Structural similarity to early developmental lignins). *Plant Physiology*, 108(3), 1277–1287.
- Lauvergeat, V., Lacombe, C., Lacombe, E., Lasserre, E., Roby, D., & Grima-Pettenati, J. (2001). Two cinnamoyl-CoA reductase (CCR) genes from Arabidopsis thaliana are differentially expressed during development and in response to infection with pathogenic bacteria. *Phytochemistry*, 57(7), 1187–1195.
- Lee, D., Meyer, K., Chapple, C., & Douglas, C. J. (1997). Antisense suppression of 4-Coumarate:Coenzyme a ligase activity in Arabidopsis leads to altered lignin subunit composition. *The Plant Cell*, 9(11), 1985–1998.
- Lee, Y., Rubio, M. C., Alassimone, J., & Geldner, N. (2013). A mechanism for localized lignin deposition in the endodermis. *Cell*, 153(2), 402–412.
- Li, B., Kamiya, T., Kalmbach, L., Yamagami, M., Yamaguchi, K., Shigenobu, S., ... Fujiwara, T. (2017). Role of LOTR1 in nutrient transport through organization of spatial distribution of root endodermal barriers. *Current Biology*, 27(5), 758–765.
- Li, X., Bonawitz, N. D., Weng, J.-K., & Chapple, C. (2010). The growth reduction associated with repressed lignin biosynthesis in Arabidopsis thaliana Is Independent of flavonoids. *The Plant Cell*, 22(5), 1620–1632.
- Lieberman, L. M., Sparks, E. E., Moreno-Risueno, M. A., Petricka, J. J., & Benfey, P. N. (2015). MYB36 regulates the transition from proliferation to differentiation in the Arabidopsis root. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(39), 12099–12104.

- MacKay, J. J., O'Malley, D. M., Presnell, T., Booker, F. L., Campbell, M. M., Whetten, R. W., & Sederoff, R. R. (1997). Inheritance, gene expression, and lignin characterization in a mutant pine deficient in cinnamyl alcohol dehydrogenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(15), 8255–8260.
- Martone, P. T., Estevez, J. M., Lu, F., Ruel, K., Denny, M. W., Somerville, C., & Ralph, J. (2009). Discovery of lignin in seaweed reveals convergent evolution of cell-wall architecture. *Current Biology*, *19*(2), 169–175.
- McCarthy, R. L., Zhong, R., & Ye, Z. H. (2009). MYB83 is a direct target of SND1 and acts redundantly with MYB46 in the regulation of secondary cell wall biosynthesis in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology*, *50*(11), 1950–1964.
- Mele, G., Ori, N., Sato, Y., & Hake, S. (2003). The knotted1-like homeobox gene BREVIPEDICELLUS regulates cell differentiation by modulating metabolic pathways. *Genes and Development*, *17*(17), 2088–2093.
- Meyer, K., Cusumano, J. C., Somerville, C., & Chapple, C. C. (1996). Ferulate-5-hydroxylase from Arabidopsis thaliana defines a new family of cytochrome P450-dependent monooxygenases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *93*(14), 6869–6874.
- Miao, Y.-C., & Liu, C.-J. (2010). ATP-binding cassette-like transporters are involved in the transport of lignin precursors across plasma and vacuolar membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(52), 22728–22733.
- Minami, E. -I, Ozeki, Y., Matsuoka, M., Koizuka, N., & Tanaka, Y. (1989). Structure and some characterization of the gene for phenylalanine ammonia-lyase from rice plants. *European Journal of Biochemistry*, *185*(1), 19–25.
- Mizutani, M., Ohta, D., & Sato, R. (1997). Isolation of a cDNA and a genomic clone encoding cinnamate 4-Hydroxylase from Arabidopsis and its expression manner in planta. *Plant Physiology*, *113*, 755–763.
- Moerschbacher, B. M., Noll, U., Gorrichon, L., & Reisener, H.-J. (1990). Specific inhibition of lignification breaks hypersensitive resistance of wheat to stem rust. *Plant Physiology*, *93*(2), 465–470.
- Nakayama, T., Shinohara, H., Tanaka, M., Baba, K., Ogawa-Ohnishi, M., & Matsubayashi, Y. (2017). A peptide hormone required for Casparian strip diffusion barrier formation in Arabidopsis roots. *Science*, *355*(6322), 284–286.
- Naseer, S., Lee, Y., Lapiere, C., Franke, R., Nawrath, C., & Geldner, N. (2012). Casparian strip diffusion barrier in Arabidopsis is made of a lignin polymer without suberin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(25), 10101–10106.
- Nedelkina, S., Jupe, S. C., Blee, K. A., Schalk, M., Werck-Reichhart, D., & Bolwell, G. P. (1999). Novel characteristics and regulation of a divergent cinnamate 4-hydroxylase (CYP73A15) from French bean: Engineering expression in yeast. *Plant Molecular Biology*, *39*(6), 1079–1090.
- Newman, L. J., Perazza, D. E., Juda, L., & Campbell, M. M. (2004). Involvement of the R2R3-MYB, AtMYB61, in the ectopic lignification and dark-photomorphogenic components of the det3 mutant phenotype. *The Plant Journal*, *37*(2), 239–250.
- Novo Uzal, E., Gómez Ros, L. V., Pomar, F., Bernal, M. A., Paradela, A., Albar, J. P., & Ros Barceló, A. (2009). The presence of sinapyl lignin in Ginkgo biloba cell cultures changes our views of the evolution of lignin biosynthesis. *Physiologia Plantarum*, *135*(2), 196–213.
- Ogawa, K., Kanematsu, S., & Asada, K. (1997). Generation of superoxide anion and localization of CuZn-superoxide dismutase in the vascular tissue of spinach hypocotyls: Their association with lignification. *Plant and Cell Physiology*, *38*(10), 1118–1126.

- Ohl, S., Hedrick, S. A., Chory, J., & Lamb, C. J. (1990). Functional properties of a Phenylalanine ammonia-lyase promoter from *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 2(9), 837–848.
- Öhman, D., Demedts, B., Kumar, M., Gerber, L., Gorzsas, A., Goeminne, G., ... Sundberg, B. (2013). MYB103 is required for Ferulate-5-hydroxylase expression and syringyl lignin biosynthesis in *Arabidopsis* stems. *Plant Journal*, 73(1), 63–76.
- Olsen, K. M., Lea, U. S., Slimestad, R., Verheul, M., & Lillo, C. (2008). Differential expression of four *Arabidopsis* PAL genes; PAL1 and PAL2 have functional specialization in abiotic environmental-triggered flavonoid synthesis. *Journal of Plant Physiology*, 165(14), 1491–1499.
- Önnerud, H., Zhang, L., Gellerstedt, G., & Henriksson, G. (2002). Polymerization of monolignols by redox shuttle-mediated enzymatic oxidation: A new model in lignin biosynthesis I. *The Plant Cell Online*, 14(8), 1953–1962.
- Paniagua, C., Bilkova, A., Jackson, P., Dabravolski, S., Riber, W., Didi, V., ... Hejatkó, J. (2017). Dirigent proteins in plants: modulating cell wall metabolism during abiotic and biotic stress exposure. *Journal of Experimental Botany*, 68(13), 3287–3301.
- Perumalla, C. J., & Peterson, C. A. (1986). Deposition of Casparian bands and suberin lamellae in the exodermis and endodermis of young corn and onion roots. *Canadian Journal of Botany*, 64(9), 1873–1878.
- Perumalla, C. J., Peterson, C. A., & Enstone, D. E. (1990). A survey of angiosperm species to detect hypodermal Casparian bands. I. Roots with a uniseriate hypodermis and epidermis. *Botanica Acta*, 103(2), 93–112.
- Pesquet, E., Zhang, B., Gorzsas, A., Puhakainen, T., Serk, H., Escamez, S., ... Tuominen, H. (2013). Non-Cell-Autonomous postmortem lignification of tracheary elements in *Zinnia elegans*. *The Plant Cell*, 25(4), 1314–1328.
- Peter, G., & Neale, D. (2004). Molecular basis for the evolution of xylem lignification. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(6), 737–742.
- Peterson, C. A., & Perumalla, C. J. (1990). A survey of angiosperm species to detect hypodermal Casparian bands. II. Roots with a multiseriate hypodermis or epidermis. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 103(2), 113–125.
- Pfister, A., Barberon, M., Alassimone, J., Kalmbach, L., Lee, Y., Vermeer, J. E., ... Geldner, N. (2014). A receptor-like kinase mutant with absent endodermal diffusion barrier displays selective nutrient homeostasis defects. *ELife*, 3, 1–20.
- Preston, J., Wheeler, J., Heazlewood, J., Song, F. L., & Parish, R. W. (2004). AtMYB32 is required for normal pollen development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 40(6), 979–995.
- Puttick, M. N., Morris, J. L., Williams, T. A., Cox, C. J., Edwards, D., Kenrick, P., ... Donoghue, P. C. J. (2018). The interrelationships of land plants and the nature of the ancestral Embryophyte. *Current Biology*, 28(5), 733–745.
- Raes, J., Rohde, A., Christensen, J. H., Van de Peer, Y., & Wout, B. (2003). Genome-wide characterization of the lignification toolbox in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 133(3), 1051–1071.
- Ralph, J., MacKay, J. J., Hatfield, R. D., O'Malley, D. M., Whetten, R. W., & Sederoff, R. R. (1997). Abnormal lignin in a loblolly pine mutant. *Science*, 277(5323), 235–239.
- Ranocha, P., McDougall, G., Hawkins, S., Sterjiades, R., Borderies, G., Stewart, D., ... Goffner, D. (1999). Biochemical characterization, molecular cloning and expression of laccases - A divergent gene family - In poplar. *European Journal of Biochemistry*, 259(1–2), 485–495.

- Reinhardt, D. H., & Rost, T. L. (1995). Salinity accelerates endodermal development and induces an exodermis in cotton seedling roots. *Environmental and Experimental Botany*, 35(4), 563–574.
- Renault, H., Alber, A., Horst, N. A., Basilio Lopes, A., Fich, E. A., Kriegshauser, L., ... Werck-Reichhart, D. (2017). A phenol-enriched cuticle is ancestral to lignin evolution in land plants. *Nature Communications*, 8, 1–8.
- Rittinger, P. A., Biggs, A. R., & Peirson, D. R. (1987). Histochemistry of lignin and suberin deposition in boundary layers formed after wounding in various plant species and organs. *Canadian Journal of Botany*, 65(9), 1886–1892.
- Roberts, A. W., Frost, A. O., Roberts, E. M., & Haigler, C. H. (2004). Roles of microtubules and cellulose microfibril assembly in the localization of secondary-cell-wall deposition in developing tracheary elements. *Protoplasma*, 224(3–4), 217–229.
- Roppolo, D., De Rybel, B., Tendon, V. D., Pfister, A., Alassimone, J., Vermeer, J. E. M., ... Geldner, N. (2011). A novel protein family mediates Casparian strip formation in the endodermis. *Nature*, 473(7347), 381–384.
- Russell, D. W. (1970). The metabolism of aromatic compounds in higher plants. X. Properties of the cinnamic acid 4-hydroxylase of pea seedlings and some aspects of its metabolic and developmental control. *J. Biol. Chem.*, 246(12), 3870–3878.
- Růžička, K., Ursache, R., Hejátko, J., & Helariutta, Y. (2015). Xylem development – from the cradle to the grave. *New Phytologist*, 207(3), 519–535.
- Saleem, M., Hyoung, J. K., Ali, M. S., & Yong, S. L. (2005). An update on bioactive plant lignans. *Natural Product Reports*, 22(6), 696–716.
- Schreiber, L., & Franke, R. B. (2011). Endodermis and exodermis in roots. *ELS*, 1–7.
- Shaipulah, N. F. M., Muhlemann, J. K., Woodworth, B. D., Van Moerkercke, A., Verdonk, J. C., Ramirez, A. A., ... Schuurink, R. C. (2016). CCoAOMT down-regulation activates anthocyanin biosynthesis in *Petunia*. *Plant Physiology*, 170(2), 717–731.
- Shen, H., Mazarei, M., Hisano, H., Escamilla-Trevino, L., Fu, C., Pu, Y., ... Dixon, R. A. (2013). A genomics approach to deciphering lignin biosynthesis in Switchgrass. *The Plant Cell*, 25(11), 4342–4361.
- Sibout, R., Eudes, A., Pollet, B., Goujon, T., Mila, I., Granier, F., ... Jouanin, L. (2003). Expression pattern of two paralogs encoding Cinnamyl alcohol dehydrogenases in *Arabidopsis*. Isolation and characterization of the corresponding mutants. *Plant Physiology*, 132(2), 848–860.
- Silber, M. V., Meimberg, H., & Ebel, J. (2008). Identification of a 4-coumarate:CoA ligase gene family in the moss, *Physcomitrella patens*. *Phytochemistry*, 69(13), 2449–2456.
- Smith, R. A., Schuetz, M., Roach, M., Mansfield, S. D., Ellis, B., & Samuels, L. (2013). Neighboring parenchyma cells contribute to *Arabidopsis* xylem lignification, while lignification of interfascicular fibers is cell autonomous. *The Plant Cell*, 25(10), 3988–3999.
- Sørensen, I., Pettolino, F. A., Bacic, A., Ralph, J., Lu, F., O'Neill, M. A., ... Willats, W. G. T. (2011). The charophycean green algae provide insights into the early origins of plant cell walls. *Plant Journal*, 68(2), 201–211.
- Staritsky, G. (1969). *The morphogenesis of the inflorescence, flower and fruit of Pyrus Nivalis Jacquin var. orientalis Terpó* (Vol. 70–5). Veenman.
- Sykes, R. W., Gjersing, E. L., Foutz, K., Rottmann, W. H., Kuhn, S. A., Foster, C. E., ... Davis, M. F. (2015). Down-regulation of p-coumaroyl quinate/shikimate 3'-hydroxylase (C3'H) and cinnamate 4-hydroxylase (C4H) genes in the lignin biosynthetic pathway of *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis* leads to improved sugar release. *Biotechnology for Biofuels*, 8(1), 1–10.

- Takeda, R., Hasegawa, J., & Shinozaki, M. (1990). The first isolation of lignans, megacerotonic acid and anthocerotonic acid, from non-vascular plants, anthocerotae (hornworts). *Tetrahedron Letters*, 31(29), 4159–4162.
- Theodoulou, F. L. (2000). Plant ABC transporters. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1465(1–2), 79–103.
- Thévenin, J., Pollet, B., Letarnec, B., Saulnier, L., Gissot, L., Maia-Grondard, A., ... Jouanin, L. (2011). The simultaneous repression of CCR and CAD, two enzymes of the lignin biosynthetic pathway, results in sterility and dwarfism in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant*, 4(1), 70–82.
- Turlapati, P. V., Kim, K. W., Davin, L. B., & Lewis, N. G. (2011). The laccase multigene family in *Arabidopsis thaliana*: Towards addressing the mystery of their gene function(s). *Planta*, 233(3), 439–470.
- Valério, L., De Meyer, M., Penel, C., & Dunand, C. (2004). Expression analysis of the *Arabidopsis* peroxidase multigenic family. *Phytochemistry*, 65(10), 1331–1342.
- Vallet, C., Chabbert, B., Czaninski, Y., & Monties, B. (1996). Histochemistry of lignin deposition during sclerenchyma differentiation in alfalfa stems. *Annals of Botany*, 78, 625–632.
- Vanholme, R., De Meester, B., Ralph, J., & Boerjan, W. (2019). Lignin biosynthesis and its integration into metabolism. *Current Opinion in Biotechnology*, 56, 230–239.
- Vanholme, R., Demedts, B., Morreel, K., Ralph, J., & W., B. (2010). Lignin biosynthesis and structure. *Plant Physiology*, 153(3), 895–905.
- Vogel, J. (2008). Unique aspects of the grass cell wall. *Current Opinion in Plant Biology*, 11(3), 301–307.
- Votrubová, O. (1997). *Anatomie rostlin*. Praha: Karolinum.
- Voxeur, A., Wang, Y., & Sibout, R. (2015). Lignification: Different mechanisms for a versatile polymer. *Current Opinion in Plant Biology*, 23, 83–90.
- Walter, M. H., Grima-Pettenati, J., Grand, C., Boudet, A. M., & Lamb, C. J. (1988). Cinnamyl-alcohol dehydrogenase, a molecular marker specific for lignin synthesis: cDNA cloning and mRNA induction by fungal elicitor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(15), 5546–5550.
- Weng, J.-K., & Clint, C. (2010). The origin and evolution of lignin biosynthesis. *New Phytologist*, 187(2), 273–285.
- Weng, J. K., Mo, H., & Chapple, C. (2010b). Over-expression of F5H in COMT-deficient *Arabidopsis* leads to enrichment of an unusual lignin and disruption of pollen wall formation. *Plant Journal*, 64(6), 898–911.
- Whetten, R., & Sederoff, R. (1995). Lignin biosynthesis. *The Plant Cell*, 7(7), 1001–1013.
- Whiting, P., & Goring, D. A. I. (1982). Chemical characterization of tissue fractions from the middle lamella and secondary wall of black spruce tracheids. *Wood Science and Technology*, 267(4), 261–267.
- Wilkinson, H. P. (1986). Leaf anatomy of *Tinomiscium* and *Fibraurea* (Menispermaceae tribe *Fibraureae*) with special reference to laticifers and astrosclereids. *Kew Bulletin*, 153–169.
- Xu, Z., Zhang, D., Hu, J., Zhou, X., Ye, X., Reichel, K. L., ... Yuan, J. S. (2009). Comparative genome analysis of lignin biosynthesis gene families across the plant kingdom. *BMC Bioinformatics*, 10(11, S3), 1–15.

- Ye, Z.-H., Kneusel, R. E., Matern, U., & Varner, J. E. (1994). An alternative methylation pathway in lignin biosynthesis in *Zinnia*. *The Plant Cell*, *6*(10), 1427–1439.
- Yoshimura, K., Masuda, A., Kuwano, M., Yokota, A., & Akashi, K. (2008). Programmed proteome response for drought avoidance/tolerance in the root of a C3 xerophyte (wild watermelon) under water deficits. *Plant and Cell Physiology*, *49*(2), 226–241.
- Zeier, J., Ruel, K., Ryser, U., & Schreiber, L. (1999). Chemical analysis and immunolocalisation of lignin and suberin in endodermal and hypodermal/rhizodermal cell walls of developing maize (*Zea mays* L.) primary roots. *Planta*, *209*(1), 1–12.
- Zeier, J., & Schreiber, L. (1997). Chemical composition of hypodermal and endodermal cell walls and xylem vessels isolated from *Clivia miniata*. *Plant Physiology*, *113*(4), 1223–1231.
- Zeier, J., & Schreiber, L. (1998). Comparative investigation of primary and tertiary endodermal cell walls isolated from the roots of five monocotyledoneous species: Chemical composition in relation to fine structure. *Planta*, *206*(3), 349–361.
- Zhang, C. H., Ma, T., Luo, W. C., Xu, J. M., Liu, J. Q., & Wan, D. S. (2015). Identification of 4CL genes in desert poplars and their changes in expression in response to salt stress. *Genes*, *6*(3), 901–917.
- Zhao, Q. (2016). Lignification: Flexibility, biosynthesis and regulation. *Trends in Plant Science*, *21*(8), 713–721.
- Zhao, Q., Nakashima, J., Chen, F., Yin, Y., Fu, C., Yun, J., ... Dixon, R. A. (2013). Laccase is necessary and nonredundant with peroxidase for lignin polymerization during vascular development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, *25*(10), 3976–3987.
- Zhong, R., Lee, C., Zhou, J., McCarthy, R. L., & Ye, Z.-H. (2008). A battery of transcription factors involved in the regulation of secondary cell wall biosynthesis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online*, *20*(10), 2763–2782.
- Zhong, R., Morrison, W. H., Negrel, J., & Ye, Z.-H. (1998). Dual methylation pathways in lignin biosynthesis. *The Plant Cell*, *10*(12), 2033–2045.
- Zhong, R., Richardson, E. A., & Ye, Z.-H. (2007). The MYB46 transcription factor is a direct target of SND1 and regulates secondary wall biosynthesis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online*, *19*(9), 2776–2792.