植物木质化过程及其调控的研究进展

郭亚玉^{1,2}, 许会敏³, 赵媛媛^{1,2}, 吴鸿洋^{1,2}, 林金星^{1,2*}

1. 北京林业大学林木分子设计育种高精尖创新中心, 北京 100083;

2. 北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083;

3. 中国农业大学生物学院, 北京 100193

* 联系人, E-mail: linjx@ibcas.ac.cn

收稿日期: 2019-06-11; 接受日期: 2019-11-22; 网络版发表日期: 2020-02-11

国家自然科学基金中德合作项目(批准号: 31761133009)和青年科学基金(批准号: 31800504)资助

摘要 植物的木质化是指木质素单体氧化聚合形成的木质素在细胞壁上沉积的过程. 由于涉及多步酶促反应, 因而它是一个被精细调控的复杂而动态的生物学过程. 木质化不仅有利于维持植物正常生命活动, 而且能够增强植物适应外界生物和非生物胁迫的能力. 更为重要的是, 植物细胞壁是地球上最为丰富的可再生能源物质, 因此, 开展植物细胞壁木质化的研究具有重要的科学意义和应用价值. 本文综合国内外的最新研究进展, 简要介绍了植物木质化的过程和细胞类型, 重点总结了木质化过程中的转录调控、microRNA调控、激素和环境调控, 以及木质化发生的最新诱导体系和成像技术. 这将有助于人们更全面深入地认识木质化, 并为木质素生物工程的开发利用奠定重要的理论基础.

关键词 木质化, 木质素, 细胞壁, 调控机制

植物尤其是树木的次生生长对人类的生产和生活具有重要的实践意义. 次生木质部即木材, 是制浆造纸、建筑业以及纺织业的原材料, 与人类的生产和生活息息相关. 植物的次生生长主要是维管形成层启动的一系列活动过程, 包括维管组织的形成、次生细胞壁(secondary cell wall, SCW)的形成、木质化(lignification)、细胞程序化死亡及心材的形成等^[1]. 其中, 木质化是指木质素单体氧化聚合形成的木质素在细胞壁上沉积的过程. 该过程主要发生于次生木质部, 能够增加木质部细胞壁的硬度和机械支撑力, 增强植物体长距离运输水分以及抵御外界生物和非生物胁迫的能力. 近年来, 随着基因组学、分子遗传学以及表观遗传学

等学科的发展, 木质化过程及其分子调控机理得到了更为深入的研究, 这已成为植物学领域研究的热点. 研究木质化的过程及其调控机制对于解析木材形成的遗传调控、探究木本植物水分和矿物质的吸收及运输机制、改良材性及提高木材生长量具有十分重要的生产实践意义. 本文就近年来植物木质化领域的最新研究展开了综述, 并对其研究前景和急需解决的问题进行了展望.

1 木质化过程

植物木质化是木质素产生并沉积在细胞壁的生物

引用格式: 郭亚玉, 许会敏, 赵媛媛, 等. 植物木质化过程及其调控的研究进展. 中国科学: 生命科学, 2020, 50: 111–122

Guo Y Y, Xu H M, Zhao Y Y, et al. Plant lignification and its regulation (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2020, 50: 111–122, doi: 10.1360/SSV-2019-0204

学过程, 主要分为细胞自主性(cell-autonomous)木质化和非细胞自主性(non-cell-autonomous)木质化^[2,3]。在细胞自主性木质化过程中, 木质素单体产生并沉积于正在分化的细胞中。而在非细胞自主性木质化过程中, 木质素单体产生于邻近的非木质化细胞, 转运并沉积于正在木质化的细胞壁上。这种非细胞自主性木质化过程, 也被称为好邻居“good neighbor”假说。木质化主要经过3个发育过程: 木质素单体在胞质中的合成, 木质素单体通过细胞膜的转运, 以及木质素单体氧化聚合在细胞壁上的沉积(图1)。目前, 木质素单体的生物合成机制已经相对清楚^[4,5], 但木质素单体的转运及氧化聚合过程仍缺乏深入研究。

1.1 木质素单体的生物合成

木质素单体通过苯丙烷和木质素特异途径在胞质中生成, 其生物合成从苯丙氨酸脱氨开始, 随后发生一

系列的羟基化、甲基化和还原反应, 其中涉及一系列连续的酶促反应。该过程主要包括3大步骤: 首先是苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonia lyase, PAL)、肉桂酸羟化酶(cinnamate 4-hydroxylase, C4H)、羟基苯乙烯CoA连接酶(4-coumaric acid: coenzyme a ligase 4CL)参与的苯丙烷途径; 然后是咖啡酸-O-转甲基酶(catechol-O-methyltransferase, COMT), 阿魏酸盐5-羟化酶(ferulate 5-hydroxylase, F5H)参与的单体甲基化反应; 最后是肉桂酰-CoA还原酶(cinnamoyl CoA reductase, CCR), 肉桂醇脱氢酶(cinnamyl alcohol dehydrogenase, CAD)参与的单体合成。其中包括了香豆醇(p-coumaryl alcohol)、松柏醇(coniferyl alcohol)和芥子醇(sinapyl alcohol)3种主要的单体。通常情况下, 木质化过程主要包括这3种木质素的单体氧化聚合, 分别聚合形成对-羟基苯基木质素(p-hydroxyphenyl lignin, H木质素)、愈创木基木质素(guaiacyl lignin, G木质素)和

图1 植物木质化的主要过程。Phe: 苯丙氨酸; Tyr: 色氨酸; PAL: 苯丙氨酸解氨酶; C4H: 肉桂酸-4-羟化酶; TAL: 酪氨酸解氨酶; 4CL: 4-香豆酸辅酶A连接酶; CSE: 咖啡酰莽草酸酯酶; CCR: 肉桂酰辅酶A还原酶; CAD: 肉桂醇脱氢酶; C3H: 香豆酸3-羟化酶; CCoAOMT: 咖啡酰辅酶A-O-甲基转移酶; HCT: 莽草酸/奎宁酸羟基肉桂酰转移酶; COMT: 咖啡酸/5-羟基阿魏酸-O-甲基转移酶; F5H: 阿魏酸-5-羟化酶; Peroxidase, POX: 过氧化物酶; Laccase, LAC: 漆酶; PM: 质膜; SCW: 次生细胞壁; PCW: 初生细胞壁; ML: 中胶层

Figure 1 The main processes of plant lignification. Phe: Phenylalanine; Tyr: Tryptophan; PAL: phenylalanine ammonia lyase; C4H: cinnamate 4-hydroxylase; TAL: tyrosine ammonia lyase; 4CL: 4-coumaric acid: coenzyme a ligase; CSE: caffeoyl shikimate esterase; CCR: cinnamoyl CoA reductase; CAD: cinnamyl alcohol dehydrogenase; C3H: coumarate 3-hydroxylase; CCoAOMT: caffeoyl-CoA O-methyltransferase; HCT: hydroxycinnamoyl transferase; COMT: catechol-O-methyltransferase; F5H: ferulate 5-hydroxylase; PM: plasma membrane; SCW: secondary cell wall; PCW: primary cell wall; ML: middle lamella

紫丁香基木质素(syringyl lignin, S木质素). 截至目前, 人们已经在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、杨树及苜蓿中开展了许多木质素单体合成基因的功能研究^[6]. 木质素单体合成基因的功能缺失, 会导致植物转录和代谢水平的复杂变化^[7].

1.2 木质素单体的转运

木质素单体的转运具有灵活性和快速性的特点^[8]. 由于木质素单体的合成发生胞质中或内质网附近^[4,9], 而不是在细胞壁上. 因此, 木质素单体从胞质合成部位穿过细胞膜并进入发育中的细胞壁涉及一系列的转运机制. 目前, 有3种假说: 被动扩散(passive diffusion, PD), 囊泡介导的胞外分泌(vesicle-associated exocytosis), 以及利用ABC转运蛋白或者质子耦合逆向运输蛋白(proton coupled antiporters)的ATP依赖的转运机制. 被动扩散假说是通过固定脂质体和磷脂双分子层可以隔离木质素单体的体外实验被证明的^[10,11]. 囊泡介导的胞外分泌是研究者在木质部管状分子(tracheary elements, TEs)中, 标记内质网和高尔基体衍生出的囊泡中发现的^[12]. 相对于前两种假说, ATP依赖的转运机制研究较多. 在拟南芥中, 人们已经鉴定出p-香豆醇的ATP依赖的转运蛋白ABCG29, 其能够转运p-香豆醇^[13]. 此外, 利用钒酸盐抑制不同树木木质部中ABC转运蛋白并不影响松柏萜(coniferin)的转运, 而质子梯度擦除剂(proton gradient erasers)则显著降低了其转运, 表明木质素单体还可以通过质子偶联逆向运输蛋白转运^[14]. 最近研究发现, 在分化的拟南芥管状分子细胞培养体系中, 一组ABCG基因(*ABCG11*, *ABCG22*, *ABCG29*和*ABCG36*)能够与*MYB58*共表达, 共同调控木质素单体合成基因的表达^[15]. 此外, 胞质中的木质素单体可以通过UDP-葡萄糖基转移酶(UDP-glucuronosyltransferase, UGT), 形成单木质素苷(monolignol glucosides)进行转运. 在双子叶植物中, 单木质素苷并不是一个重要的中间产物^[16], 而在裸子植物中, 松柏萜却是木质化过程中一个重要的中间产物^[17]. 总之, 木质素单体向细胞壁内木质化部位转运的机制尚不清楚, 仍需要进一步的研究.

1.3 木质素单体的氧化聚合与沉积

木质素单体在胞内自由移动, 固定的氧化酶终止其移动并决定木质素聚合物的形成位置. 研究表明,

植物漆酶(laccases, LAC)^[9]和III型的过氧化物酶(peroxidases, POX)^[18]可以催化木质素单体的氧化聚合. 其中, 漆酶是一类含铜的多酚氧化糖蛋白, 在木质化的组织中表达量较高, 并在特定细胞类型木质化过程中发挥作用^[19]. 另外, 有研究发现, 过氧化物酶也在木质化的组织中表达, 并且漆酶和过氧化物酶能够先后发挥作用. 一旦漆酶起始氧化聚合, 过氧化物酶甚至能够在木质素、半纤维素和伸展蛋白之间形成刚性交联, 进而影响木质化^[20]. 在杨树中, 采用反义RNA的方法下调*ptLAC3*并不能改变木质素的含量和组成, 却能够改变木纤维细胞壁的完整性^[21]. 另外, 下调*ptLAC2*虽然不能改变木质素的含量, 却能够降低S/G的比例^[22]. 在拟南芥中, *AtLAC4/11/17*单突和双突的植株茎干几乎没有任何表型, 双突中G型木质素的含量显著下降. 在*AtLAC4/11/17*三突变体中, 植株严重矮化, 茎干中木质素含量几乎为零, 凯氏带中的木质化程度并没有改变^[23]. 另外有研究报道, 拟南芥中凯氏带的木质化依赖于*AtPRX6*, 下调*AtPRX64*的表达能够严重降低凯氏带的木质化程度^[24]. *AtPRX2*, *AtPRX71*和*AtPRX25*的单突或者双突能够在不影响株高的情况下减少木质素的积累^[25,26]. 而木质部管状分子和纤维的木质化则依赖于*AtLAC4*, *AtLAC11*和*LAC17*. 以上研究表明, 漆酶和过氧化物酶独立又相互依存地发挥功能.

2 植物的木质化

2.1 木质化过程中细胞壁结构和成分的变化

通过利用组织化学和荧光显微镜技术, 对杨树发育中木质部细胞次生壁的3层结构(S1, S2和S3)的木质素沉积进行研究, 发现木质化存在3个阶段: 首先, 木质素在初生壁角隅和中胶层沉积; 其次, 微纤丝在果胶质等分子参与下不断聚合形成S1和S2层, 木质素开始沿角隅处往次生壁多层结构及胞间层其他区域扩展; 最后, 当S3开始形成时, 整个细胞内壁上的木质素开始快速沉积^[27]. 最近, Lion等人^[28]通过应用新型双正交荧光探针标记的方法, 详细地描述了这种木质素沉积过程. 在不同类型的植物细胞中, 由于木质素沉积时间、木质化的速度和选择性沉积的方式等存在差异, 其形成的次生壁中木质素组分也不尽相同^[29]. 被子植物细胞壁所含的3类主要木质素单体沉积顺序大致为: H型、G型和S型木质素; 并且导管细胞中木质素含量

高于纤维细胞, 纤维细胞具有较高的S/G比例. 此外, 木质素单体具有多样性, 在仙人掌科(Cactaceae)的一些物种中, 还发现了由咖啡醇(caffeyl alcohol)衍生出来的C型木质素^[30].

2.2 木质化的细胞类型及其结构

细胞壁木质化发生在不同类型细胞的分化过程中, 不同类型的细胞产生不同的次生细胞壁增厚模式. 木质化的细胞类型有管状分子(TEs)、内皮层细胞(endodermal cells)、厚壁组织细胞(sclerenchyma cells)和种皮细胞(seed coat cells)等. 在不同的细胞类型中, 木质素的沉积时间和位置对于植物的正常生长和适应环境至关重要. 管状分子是木质部的重要组成部分, 通过细胞凋亡去除细胞内容物, 进而通过木质化来加厚次生细胞壁, 负责水分和矿物质的运输. 裸子植物中的TEs主要由G型木质素组成, H型较少; 在被子植物中, TEs主要含有G型木质素. 内皮层细胞的质膜和非原生质体空间被木质素和木栓质组成的凯氏带紧密地连接起来, 形成细胞外屏障, 选择性地允许水和溶质进入根维管系统^[31,32]. 在单子叶植物中, 凯氏带中木质素是有G和S型, 而双子叶植物中H和G型木质素的含量要高于S型^[33]. 厚壁组织细胞是另外一种木质化细胞, 主要包括纤维和石细胞(sclereids). 厚壁组织纤维和石细胞

木质化的次生细胞壁主要由S型木质素组成^[34]. 此外, 在种子发育过程中, 种皮细胞发育出大量木质化的次生细胞壁, 加固种子外表面的机械强度. 值得一提的是, 被子植物中兰花和仙人掌科的种皮木质素不同于其他物种, 由典型的G和S型和非典型的C型木质素的混合组成^[30].

3 木质化过程的转录与信号调控网络

在植物发育过程中, 次生壁的木质化过程受到外界环境因素和内在遗传因素的调控, 涉及多层次、多种转录因子的协同作用. 由于木质素是植物生长发育中的一种次生代谢产物, 其单体合成和氧化聚合途径受转录因子、microRNA以及激素等多种条件的制约, 从而影响了细胞次生壁的木质化过程. 其中, 以NAC-MYB^[35-37]转录因子家族成员为主体的调控网络, 已经得到了较为清楚的阐释(图2).

3.1 转录因子

一般情况下, NAC和MYB作为主要的调控因子直接诱导多数基因的表达. 研究报道了NAC介导的次生壁合成转录调控网络在整个维管植物中是保守的^[38]. 一些NAC类转录因子位于次生壁合成调控网络的上

图2 木质化转录调控网络

Figure 2 Transcriptional network of lignification

游, 通过与不同MYB类转录因子的结合, 间接对各分支途径包括木质素的生物合成进行调控. 一般而言, VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN (VND) 1–7和NAC SECONDARY WALL THICKENING PROMOTING FACTOR (NST) 1–3, 是整个转录调控的“开关分子”, 这两种类型的NAC转录因子通过相同的下游靶标基因或者非重叠直接靶标, 来控制维管细胞分化和束间纤维木质化^[39,40]. VND6, VND7, NST1和SND1/NST3等NAC主要调控因子在很大程度上通过诱导两个MYB转录因子即MYB46和MYB83来启动木质部分化过程^[41,42]. 如AtMYB46或者AtMYB83能够促进木质素合成相关基因的表达, 导致不正常的次生细胞壁加厚^[43]. 这些MYB46/83激活另外的转录因子和酶的表达, 在SCW的生物合成中直接起作用, 从而促进或抑制木质素的生物合成.

此外, 一些MYB转录因子作用在SND1下游, 它们不仅可以作为转录激活因子, 还可以作为转录抑制因子来调控木质素的合成. MYB58和MYB63是木质素特异性的转录激活因子^[44], 在拟南芥中过表达MYB58或MYB63, 会导致表皮和叶肉细胞的异常木质化. 过表达MYB58/63在高粱(*Sorghum bicolor*)和玉米中(*Zea mays*)的同源基因, *SbMYB60*和*ZmMYB19/Zm1*, 能够少量增加木质素的含量^[45], 并通过激活竞争性的类黄酮合成途径, 减少木质素单体途径的代谢通量. 此外, MYB26可以调控药室内壁(endothecium)的木质化, 在木质素合成途径的上游发挥作用^[46]. 拟南芥中木质素合成过程中的转录抑制因子包括AtMYB32和AtMYB4. 在烟草中过表达*AtMYB4*会导致木质素合成相关基因显著下调, 并抑制烟草的生长^[47]. 在*Atmyb32*突变体中, AtMYB32能够与COMT启动子结合并上调突变体中的COMT表达^[48]. 此外, 在其他物种中也鉴定出了一些转录抑制因子. 譬如, 桉树(*Eucalyptus robusta*)的*EgMYB1*可以下调*EgCCR*和*EgCAD*的表达^[49], 玉米的*ZmMYB31*能够降低转基因拟南芥植株的木质素含量, 使植株出现矮化表型^[50].

E2Fc作为负调节因子, 是VND6和VND7的上游调控元件^[51]. 它作为激活因子或者抑制因子, 以剂量依赖性方式调节VND6和VND7的表达. 此外, E2Fc还可以结合到许多其他次生细胞壁生物合成基因的启动子上, 包括木质素生物合成基因*C4H*, *CCoAMT*, *CAD*和*LAC4*. 然而, E2Fc是否直接调控木质素合成基因, 还需要进一

步实验验证. 另有研究表明, AtWRKY12能够抑制髓心细胞中次生细胞壁的加厚, 这种参与维持初生细胞壁生长的功能具有组织特异性^[52]和保守性^[53,54]. 最近, 拟南芥HD-ZIP III转录因子HB15也被鉴定为抑制髓心细胞中次生细胞壁的加厚的转录因子. 干扰AtHB15的表达能引起髓心细胞的异位木质化^[55]. 在*AtHB15*突变体中, WRKY12表达量上调, 髓心细胞的木质化程度显著提高^[55]. 这些研究表明, WRKY12需要与其他转录因子相互作用, 来维持髓心细胞初生细胞壁的正常发育. 因此, 木质化过程中, 有关转录因子对木质素合成关键基因的调控以及转录因子之间互作的研究, 为构建木质素合成调控网络奠定了坚实的理论基础.

3.2 mircoRNA

许多小RNA能够参与调节次生细胞壁合成过程中的木质化. 研究人员利用高通量测序技术分析发现, 马占相思树(*Acacia mangium*)中存在许多木质素合成相关的microRNA^[56]. 此外, 一些保守的铜离子相关的microRNA, 如miR397, miR398, miR408和miR857能够负调控铜蛋白家族的某些成员(譬如漆酶)的表达^[57], 从而间接调控次生壁的木质化. 此外, 杨树中特有的miR1444也是一个保守的铜离子响应microRNA^[58]. 另外, 研究表明, miR397的靶基因漆酶能够参与细胞壁的木质化和次生壁的加厚^[59]. 例如, Lu等人^[60]在毛果杨(*Populus trichocarpa*)中鉴定出一系列漆酶基因(*laccase*, *LACs*), 并确定它们是Ptr-miR397a的靶基因. Ptr-miR397a在LACs介导的木质素合成中起负调控作用, 并且miR397介导的漆酶调控在其他物种中是高度保守的^[61]. 在拟南芥中, miR397b可以负调控LAC4. 过表达miR397b能够减少木质素的沉积, 降低导管和纤维细胞壁厚度^[61]. 另外, 有研究报道拟南芥转录因子SPL7(SQUAMOSA promoter binding protein-like7)能够通过调控miR408进而调控拟南芥的营养生长^[62]. 最新的研究发现, 玉米*ZmmiR528*能够通过负调控*ZmLAC3*和*ZmLAC5*, 进而调控木质素的生物合成, 最终调节木质化^[63]. 以上有关microRNA参与调控木质化的研究, 为植物木质化的遗传改良等提供了更丰富的有效途径.

3.3 植物激素

植物激素是调控木质化发育的重要信号分子. 生

长素及其极性运输在维持组织特化分化和发育过程中起着重要的作用^[64]。有研究报道, 生长素在花药开裂前达到峰值, 在药室内壁发生木质化时下降。例如, 在生长素受体突变体 $afb1-3$ 和 $tir1\ afb2\ afb3$ 中, 编码药室内壁木质化所需转录因子MYB26的基因在早期特异性过度表达, 可通过负调控MYB26来控制蒴内层的木质化, 促使药室内壁的木质化和花药的开裂早于野生型^[65]。最新鉴定出的开花相关的剪接体ARF8.4, 能够与AUX/IAA19和MYB26启动子中的生长素相关元件结合, 并激活它们的转录, 从而控制花丝伸长和药室内壁的木质化^[66]。另外一种参与调控木质素生物合成的植物激素是细胞分裂素。例如, ABCG14是一种新发现的细胞分裂素转运体^[67]。降低ABCG14的表达, 能够降低细胞分裂素水平, 从而导致木质素生物合成延迟, 减少木质化细胞数量^[67]。赤霉素对于木质部的发育是必需的, 能够促进纤维的伸长^[68], 木质部的扩张^[69]和次生生长^[70,71]。研究者在百日草(*Zinnia elegans*)木质部发生组培体系施加GA₃后发现, 管状分子的分化及木质素含量显著增加。相反, 施加GA生物合成抑制剂则降低管状分子的分化^[72]。其他的研究表明, WOX14而非WOX4能够促进拟南芥花序茎中的维管细胞的分化和木质化^[73]。此外, Rao等人^[74]发现, 施加油菜素内酯(brassinosteroids, BR)可以诱导细胞壁木质化。植物对植物激素具有敏感性, 因此, 利用植物激素来改变植物木质化的程度具有非常高的可行性和实效性。

3.4 其他因子

与木质素生物合成的转录调控相比, 木质素生物合成酶翻译后修饰的相关研究较少。在拟南芥中, 木质素单体生物合成的第一种酶——苯丙氨酸裂解酶, 在翻译后由Kelch重复F-Box(KFB)介导的蛋白泛素化调节^[75]。拟南芥KFB1, KFB20和KFB50通过泛素化-26S蛋白酶体途径介导4种PAL亚型进行转换^[75]。除泛素化外, PAL的磷酸化也有相关报道。拟南芥钙依赖激酶(AtCPK1)能够在玉米原生质体系统中对PAL进行磷酸化修饰^[76]。在毛果杨中, 也发现了PAL的磷酸化修饰^[77]。此外, 除了直接对木质化的调控外, 多亚基的转录共调控因子也能够间接调控木质素的生物合成, 譬如, 在C3H的缺失突变体中, 敲除MED5a和MED5b能够恢复木质素缺失的表型^[78]。然而, 敲除MED5a和

MED5b并不能完全补偿C3H活性的损失。另外, 在缺失F5H的情况下, MED5a和MED5b能够抑制羟基肉桂酸酯(hydroxycinnamate esters)和花青素(anthocyanin)的生物合成^[79]。MED5a和MED5b能够维持苯丙烷代谢的稳态, 在苯丙烷和吲哚族芥子油苷(indole glucosinolate)代谢通路中是必需的^[80]。

一般情况下, 细胞壁的木质化发生在不同细胞类型的分化过程和特定的环境中, 比如机械损伤、病原体的攻击、干旱、温度的变化、CO₂和UV等也能引起木质化的发生和改变。防御诱导的木质化是植物免疫反应中一种保守的防御机制。例如, 拟南芥SG2型的R2R3-MYB转录因子MYB15是防御诱导的木质化和基础免疫的调节因子, MYB15可以直接与包含AC元件的次生壁合成相关的MYB转录因子结合从而启动木质化^[81]。总之, 深入探究木质素生物合成与植物生长和防御联合调控网络, 将有助于通过遗传改良的方法, 增强能源作物和农作物的抗逆性, 进而提高生物燃料和芳香族化合物的利用率。

4 木质化的实验体系及成像技术

4.1 研究木质化的实验体系

长期以来, 树木受到生长周期长、取材困难、易受生长季限制等不利因素的影响, 导致树木木质化的研究进展缓慢。管状分子是植物木质部的主要组成成分, 是高度特化的细胞。对管状分子发育过程的研究有助于更精细地了解植物木质化的调控机制。多年来, 学者们建立了整体实验系统和离体实验系统, 对植物木质化过程进行了形态学观察和生理学检测, 如拟南芥、百日草等离体培养系统。百日草离体培养诱导管状分子分化的实验系统是最早建立的木质化发生实验体系。利用百日草幼嫩叶片获得的游离叶肉单细胞在生长素和细胞分裂素等植物激素的诱导下, 可以成功脱分化形成管状分子。最近, 日本东京大学Fukuda研究组报道了一种新的拟南芥子叶诱导管状分子分化体系(vascular cell induction culture system using Arabidopsis leaves, VISUAL)^[82], 2018年他们又对该实验体系进行了详细的综述^[83]。这些模式系统的建立可为研究植物木质化过程提供良好的平台, 从而可在分子水平上认识细胞分化进程及其调控机制, 最终运用于木材改良和生物质资源的利用^[84]。

4.2 木质化的成像技术

除了对植物木质化过程研究体系的改良, 细胞壁成像技术的发展也为研究木质化过程提供了非常有效的检测手段. 与蛋白质不同, 木质素不能够通过基因标记的方法在活体中进行可视化研究. 利用新技术精细观察次生木质部的发育, 有助于人们更深入地研究木质化过程, 并进一步探究木质素生物合成. 传统成像技术, 如光学和电子显微观察、光谱检测、基于质谱的化学成像, 以及使用木质素特异性抗体的免疫标记, 已经应用于木质化的可视化检测中. 利用透射电子显微镜, 本研究组^[85]对毛竹(*Phyllostachys pubescens*)茎纤维次生壁形成过程的超微结构进行了观察, 发现随着次生壁的进一步加厚及木质化, 细胞壁形成了宽窄间隔排列的多层结构. Lion等人^[28]报道了一种在体内观察植物细胞壁木质化的多重标记技术. 该方法使用两种不同的木质素前体类似物, 分别标记有叠氮化物和炔标记, 可独立地整合到细胞壁上. 然而, 这些方法通常在灵敏度、特异性、样品制备时间、样品固定以及对活体植物系统的适用性方面存在一些缺点.

近年来, 不断发展起来的非标记成像技术, 已经被越来越多地运用到木质化发生的研究中. 傅里叶变换红外光谱(Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR)、傅里叶变换拉曼光谱(Fourier transform Raman spectroscopy, FT Raman)和激光共聚焦拉曼光谱(confocal Raman microspectroscopy, CRM)不仅能够检测细胞壁的主要成分, 如木质素的含量, 而且可以用来观察细胞壁微分区的变化. 譬如, CRM可以用于测定杨树、拟南芥、芒草的天然木质素的组成和化学性质, 以及转基因毛果杨木质素组成的变化^[86]. 最近发展起来的相干拉曼散射显微术(coherent Raman scattering microscopy)是一类基于拉曼散射的光学显微成像技术, 主要包括相干反斯托克斯拉曼散射(coherent anti-Stokes Raman scattering, CARS)^[87,88]和受激拉曼散射(stimulated Raman scattering, SRS)^[89-91]两种方法, 它们可以对脂类、木质素和纤维素等不易被标记的物质成像. 利用拉曼光谱分析的方法, 本研究组发现, 杉木细胞壁成分从活跃期到转换期发生了很大的变化. 在休眠期, 径向壁有更多的果胶和较少的木质素, 而在其他阶段则没有明显的变化. 对细胞壁修饰的分析为研究形成层活动和木材形成提供了重要信息^[92], 同时,

本研究组^[93]对维管形成层年周期活动中细胞壁形态特征及调控机制进行了概述. 此外, 本研究组^[94]还对拟南芥木质化过程进行了研究, 利用SRS成像技术来分析拟南芥过表达miR857和野生型植株中茎干木质素的分布, 证明了miR857影响次生木质部细胞壁中木质素的含量. 在玉米根的不同发育时期, 利用SRS的方法, 本研究组^[95]观察了玉米凯氏带中木质素和木栓质的积累模式. 最近, 本研究组^[96]对各种细胞壁成像技术进行了综述. 这些原位、非标记检测技术为深入分析木质化过程及其调控机制提供了简便和精确的技术支持. 下表对木质化过程研究中的几种非标记成像技术进行了比较和总结(表1).

5 展望

近年来, 植物木质化一直是人类高度关注的科学问题. 一方面, 木质化是植物从低等到高等进化过程中适应陆地生存环境的关键, 是植物从水生到陆生演化, 并能够在陆地上繁荣的重要前提之一. 探究植物的木质化过程, 将有助于阐释植物遗传进化、生长发育和环境适应的分子机制. 另一方面, 树木的木质化组织即木材是地球上最重要的可再生资源, 同时又是生物质能源的主要原料. 木材产量的提高及品质的改良, 对生物质的高效转化利用具有十分重要的战略意义.

目前, 木质化过程及其调控机制的研究现状, 仍然存在一些问题亟需解决. (i) 植物会产生不同的木质化细胞类型来维持正常的生长和环境适应. 然而, 这些不同类型的木质化细胞的木质素沉积方式有什么不同? 管状分子产生的环纹、螺纹、网纹等增厚模式的机制是什么? (ii) 除了转录因子、植物激素、micro-RNA等调控因子外, 可能存在其他信号参与调控植物木质化过程. 譬如多肽、受体激酶和其响应的受体对木质素的沉积, 以及细胞骨架参与的植物木质化机制尚不清楚. (iii) 木质素单体通过细胞膜定向运输到氧化聚合位点以及氧化聚合的调控机制仍不明确. 不同的木质素单体是否对应不同的转运方式? 漆酶和过氧化物酶是如何协同又独立地发挥作用? 目前, 木质化发生体系的优化以及非标记成像技术的发展, 将有助于揭示这些问题的内在奥秘.

综上, 木质化过程是极其复杂和动态的, 涉及多层次、多种转录因子的协同作用. 近年来, 随着组学研究

表 1 木质化非标记成像技术

Table 1 Label-free imaging techniques for lignification

方法	原理及描述	优点	缺点	参考文献
傅里叶变换红外光谱, FTIR	首先要对切片进行干燥处理, 然后利用红外吸收法对木质素进行原位分析. 植物切片的空间分辨率为5~20 μm .	能够避免荧光背景的干扰.	空间分辨率受衍射极限的限制. 很难在亚细胞水平获得高质量的图像. 不能活体成像.	[97,98]
激光共聚焦拉曼光谱, CRM	一种非损伤的原位观测方法, 能够对木质素进行原位非标记成像. 植物材料的像素驻留时间为0.1~1 s.	分子振动具有较高的空间分辨率.	成像所需时间比较长, 拉曼散射效应较弱. 荧光背景的存在不利于拉曼图像的分析, 很难获得高质量的图片. 不能进行高分辨率的活细胞动态追踪.	[86,92,99]
相干反斯托克斯拉曼散射, CARS	与CRM相比, CARS显微镜通过将激发能聚焦到特定的拉曼模式上, 获得了更强的拉曼信号. 横向分辨率为~350 nm.	提供亚细胞空间分辨率进行成像, 图像采集速度比普通拉曼显微镜高4个数量级以上.	会产生光谱失真. 不需要的非共振背景会导致有限的灵敏度. 非线性浓度依赖性和相干图像伪影, 使得定量解释和应用变得困难.	[87,88]
受激拉曼散射, SRS	与CARS相比, SRS显微镜不存在非共振背景, 且与分析物浓度呈线性关系, 从而提供定量分析. 衍射极限的空间分辨率可达350 nm, 像素停留时间为50 μs .	可以高速成像, 能够很容易地捕捉到整个活细胞的高度动态过程.	需要达到一定的丰度, 才能检测到具有典型分子振动的化学成分.	[89~91]

技术和基因工程的发展, 研究人员可以在分子水平上“重新设计”木质素, 使之具备更多元化的性质, 这已经成为木质化研究的一个热点. 运用转基因技术改变木质素聚合物的长度, 减少交联到碳水化合物上的程度, 加入不稳定的链接等, 以期提高生物质能源转

换效率. 此外, 值得注意的是, 合成生物学作为21世纪新兴的生物学研究领域, 有望阐明并模拟植物木质化的基本过程. 通过人工设计并构建崭新的木质化发生系统, 开发高效的生物质能源, 从而满足人们的各种需求.

参考文献

1 Tian M, Xia Q M, Li J Y. The secondary growth in plant and its molecular regulation (in Chinese). *Hereditas*, 2007, 29: 1324–1330 [田敏, 夏琼梅, 李纪元. 植物的次生生长及其分子调控. *遗传*, 2007, 29: 1324–1330]

2 Smith R A, Schuetz M, Karlen S D, et al. Defining the diverse cell populations contributing to lignification in *Arabidopsis* stems. *Plant Physiol*, 2017, 174: 1028–1036

3 Smith R A, Schuetz M, Roach M, et al. Neighboring parenchyma cells contribute to *Arabidopsis* xylem lignification, while lignification of interfascicular fibers is cell autonomous. *Plant Cell*, 2013, 25: 3988–3999

4 Barros J, Serk H, Granlund I, et al. The cell biology of lignification in higher plants. *Ann Bot*, 2015, 115: 1053–1074

5 Zhao Q. Lignification: Flexibility, biosynthesis and regulation. *Trends Plant Sci*, 2016, 21: 713–721

6 Bonawitz N D, Chapple C. The genetics of lignin biosynthesis: Connecting genotype to phenotype. *Annu Rev Genet*, 2010, 44: 337–363

7 Vanholme R, Storme V, Vanholme B, et al. A systems biology view of responses to lignin biosynthesis perturbations in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2012, 24: 3506–3529

8 Perkins M, Smith R A, Samuels L. The transport of monomers during lignification in plants: Anything goes but how? *Curr Opin Biotech*, 2019, 56: 69–74

9 Schuetz M, Benske A, Smith R A, et al. Laccases direct lignification in the discrete secondary cell wall domains of protoxylem. *Plant Physiol*, 2014, 166: 798–807

10 Boija E, Johansson G. Interactions between model membranes and lignin-related compounds studied by immobilized liposome chromatography. *BBA-Biomembranes*, 2006, 1758: 620–626

- 11 Boija E, Lundquist A, Edwards K, et al. Evaluation of bilayer disks as plant cell membrane models in partition studies. *Anal Biochem*, 2007, 364: 145–152
- 12 Takeuchi M, Kegasa T, Watanabe A, et al. Expression analysis of transporter genes for screening candidate monolignol transporters using *Arabidopsis thaliana* cell suspensions during tracheary element differentiation. *J Plant Res*, 2018, 131: 297–305
- 13 Pickett-Heaps J D. Xylem wall deposition. *Protoplasma*, 1968, 65: 181–205
- 14 Alejandro S, Lee Y, Tohge T, et al. AtABCG29 is a monolignol transporter involved in lignin biosynthesis. *Curr Biol*, 2012, 22: 1207–1212
- 15 Tsuyama T, Kawai R, Shitan N, et al. Proton-dependent coniferin transport, a common major transport event in differentiating xylem tissue of woody plants. *Plant Physiol*, 2013, 162: 918–926
- 16 Le Roy J, Huss B, Creach A, et al. Glycosylation is a major regulator of phenylpropanoid availability and biological activity in plants. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 735
- 17 Aoki D, Hanaya Y, Akita T, et al. Distribution of coniferin in freeze-fixed stem of *Ginkgo biloba* L. by cryo-TOF-SIMS/SEM. *Sci Rep*, 2016, 6: 31525
- 18 Shigeto J, Tsutsumi Y. Diverse functions and reactions of class III peroxidases. *New Phytol*, 2016, 209: 1395–1402
- 19 Wang Y, Bouchabke-Coussa O, Lebris P, et al. LACCASE5 is required for lignification of the *Brachypodium distachyon* culm. *Plant Physiol*, 2015, 168: 192–204
- 20 Passardi F, Penel C, Dunand C. Performing the paradoxical: How plant peroxidases modify the cell wall. *Trends Plant Sci*, 2004, 9: 534–540
- 21 Ranocha P, Chabannes M, Chamayou S, et al. Laccase down-regulation causes alterations in phenolic metabolism and cell wall structure in poplar. *Plant Physiol*, 2002, 129: 145–155
- 22 Bryan A C, Jawdy S, Gunter L, et al. Knockdown of a laccase in *Populus deltoides* confers altered cell wall chemistry and increased sugar release. *Plant Biotechnol J*, 2016, 14: 2010–2020
- 23 Zhao Q, Nakashima J, Chen F, et al. LACCASE is necessary and nonredundant with PEROXIDASE for lignin polymerization during vascular development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2013, 25: 3976–3987
- 24 Lee Y, Rubio M C, Alassimone J, et al. A mechanism for localized lignin deposition in the endodermis. *Cell*, 2013, 153: 402–412
- 25 Shigeto J, Kiyonaga Y, Fujita K, et al. Putative cationic cell-wall-bound peroxidase homologues in *Arabidopsis*, AtPrx2, AtPrx25, and AtPrx71, are involved in lignification. *J Agric Food Chem*, 2013, 61: 3781–3788
- 26 Shigeto J, Itoh Y, Hirao S, et al. Simultaneously disrupting AtPrx2, AtPrx25 and AtPrx71 alters lignin content and structure in *Arabidopsis* stem. *J Integr Plant Biol*, 2015, 57: 349–356
- 27 Donaldson L A. Lignification and lignin topochemistry—An ultrastructural view. *Phytochemistry*, 2001, 57: 859–873
- 28 Lion C, Simon C, Huss B, et al. BLISS: A bioorthogonal dual-labeling strategy to unravel lignification dynamics in plants. *Cell Chem Biol*, 2017, 24: 326–338
- 29 Gritsch C S, Murphy R J. Ultrastructure of fibre and parenchyma cell walls during early stages of culm development in *Dendrocalamus asper*. *Ann Bot*, 2005, 95: 619–629
- 30 Chen F, Tobimatsu Y, Jackson L, et al. Novel seed coat lignins in the Cactaceae: Structure, distribution and implications for the evolution of lignin diversity. *Plant J*, 2013, 73: 201–211
- 31 Doblas V G, Geldner N, Barberon M. The endodermis, a tightly controlled barrier for nutrients. *Curr Opin Plant Biol*, 2017, 39: 136–143
- 32 Geldner N. The endodermis. *Annu Rev Plant Biol*, 2013, 64: 531–558
- 33 Naseer S, Lee Y, Lapierre C, et al. Casparian strip diffusion barrier in *Arabidopsis* is made of a lignin polymer without suberin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 10101–10106
- 34 Higuchi T. Lignin biochemistry: Biosynthesis and biodegradation. *Wood Sci Technol*, 1990, 24: 23–63
- 35 Guo G X, Bai F, Liu W, et al. Advances in research of the regulation of transcription factors of lignin biosynthesis (in Chinese). *Sci Agri Sin*, 2015, 48: 1277–1287 [郭光艳, 柏峰, 刘伟, 等. 转录因子对木质素生物合成调控的研究进展. 中国农业科学, 2015, 48: 1277–1287]
- 36 Huang C, Li L G. Research progress on regulation of plant secondary cell wall thickening (in Chinese). *Plant Physiol J*, 2016, 1: 8–18 [黄成, 李来庚. 植物次生细胞壁加厚调控研究进展. 植物生理学报, 2016, 1: 8–18]
- 37 Zhang B C, Zhou Y H. Plant cell wall formation and regulation (in Chinese). *Sci Sin Vitae*, 2015, 45: 544–556 [张保才, 周奕华. 植物细胞壁形成机制的新进展. 中国科学: 生命科学, 2015, 45: 544–556]
- 38 Ye Z H, Zhong R. Molecular control of wood formation in trees. *J Exp Bot*, 2015, 66: 4119–4131

- 39 Zhong R, Lee C, Ye Z H. Global analysis of direct targets of secondary wall NAC master switches in *Arabidopsis*. *Mol Plant*, 2010, 3: 1087–1103
- 40 Ohashi-Ito K, Oda Y, Fukuda H. *Arabidopsis* vascular-related NAC-DOMAIN6 directly regulates the genes that govern programmed cell death and secondary wall formation during xylem differentiation. *Plant Cell*, 2010, 22: 3461–3473
- 41 Zhong R, Richardson E A, Ye Z H. The MYB46 transcription factor is a direct target of SND1 and regulates secondary wall biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2007, 19: 2776–2792
- 42 McCarthy R L, Zhong R, Ye Z H. MYB83 is a direct target of SND1 and acts redundantly with MYB46 in the regulation of secondary cell wall biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol*, 2009, 50: 1950–1964
- 43 Ko J H, Kim W C, Han K H. Ectopic expression of MYB46 identifies transcriptional regulatory genes involved in secondary wall biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant J*, 2009, 60: 649–665
- 44 Zhou J, Lee C, Zhong R, et al. MYB58 and MYB63 are transcriptional activators of the lignin biosynthetic pathway during secondary cell wall formation in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2009, 21: 248–266
- 45 Scully E D, Gries T, Sarath G, et al. Overexpression of *SbMyb60* impacts phenylpropanoid biosynthesis and alters secondary cell wall composition in *Sorghum bicolor*. *Plant J*, 2016, 85: 378–395
- 46 Yang C, Xu Z, Song J, et al. *Arabidopsis* MYB26/MALE STERILE35 regulates secondary thickening in the endothecium and is essential for anther dehiscence. *Plant Cell*, 2007, 19: 534–548
- 47 Jin H, Cominelli E, Bailey P, et al. Transcriptional repression by AtMYB4 controls production of UV-protecting sunscreens in *Arabidopsis*. *EMBO J*, 2000, 19: 6150–6161
- 48 Preston J, Wheeler J, Heazlewood J, et al. AtMYB32 is required for normal pollen development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 2004, 40: 979–995
- 49 Legay S, Lacombe E, Goicoechea M, et al. Molecular characterization of EgMYB1, a putative transcriptional repressor of the lignin biosynthetic pathway. *Plant Sci*, 2007, 173: 542–549
- 50 Fornalé S, Shi X, Chai C, et al. ZmMYB31 directly represses maize lignin genes and redirects the phenylpropanoid metabolic flux. *Plant J*, 2010, 64: 633–644
- 51 Taylor-Teeples M, Lin L, de Lucas M, et al. An *Arabidopsis* gene regulatory network for secondary cell wall synthesis. *Nature*, 2015, 517: 571–575
- 52 Wang H, Aveci U, Nakashima J, et al. Mutation of WRKY transcription factors initiates pith secondary wall formation and increases stem biomass in dicotyledonous plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 22338–22343
- 53 Yang L, Zhao X, Yang F, et al. PtrWRKY19, a novel WRKY transcription factor, contributes to the regulation of pith secondary wall formation in *Populus trichocarpa*. *Sci Rep*, 2016, 6: 18643
- 54 Gallego-Giraldo L, Shadle G, Shen H, et al. Combining enhanced biomass density with reduced lignin level for improved forage quality. *Plant Biotechnol J*, 2016, 14: 895–904
- 55 Du Q, Aveci U, Li S, et al. Activation of *miR165b* represses *AtHBI5* expression and induces pith secondary wall development in *Arabidopsis*. *Plant J*, 2015, 83: 388–400
- 56 Ong S S, Wickneswari R. Expression profile of small RNAs in *Acacia mangium* secondary xylem tissue with contrasting lignin content-potential regulatory sequences in monolignol biosynthetic pathway. *BMC Genomics*, 2011, 12: S13
- 57 Abdel-Ghany S E, Pilon M. MicroRNA-mediated systemic down-regulation of copper protein expression in response to low copper availability in *Arabidopsis*. *J Biol Chem*, 2008, 283: 15932–15945
- 58 Lu S, Yang C, Chiang V L. Conservation and diversity of microRNA-associated copper-regulatory networks in *Populus trichocarpa*. *J Integr Plant Biol*, 2011, 53: 879–891
- 59 Luo Y C, Zhou H, Li Y, et al. Rice embryogenic calli express a unique set of microRNAs, suggesting regulatory roles of microRNAs in plant post-embryogenic development. *FEBS Lett*, 2006, 580: 5111–5116
- 60 Lu S, Li Q, Wei H, et al. Ptr-miR397a is a negative regulator of laccase genes affecting lignin content in *Populus trichocarpa*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 10848–10853
- 61 Wang C Y, Zhang S, Yu Y, et al. MiR397b regulates both lignin content and seed number in *Arabidopsis* via modulating a laccase involved in lignin biosynthesis. *Plant Biotechnol J*, 2014, 12: 1132–1142
- 62 Zhang H, Li L. SQUAMOSA promoter binding protein-like7 regulated microRNA408 is required for vegetative development in *Arabidopsis*.

- Plant J*, 2013, 74: 98–109
- 63 Sun Q, Liu X, Yang J, et al. MicroRNA528 Affects lodging resistance of Maize by regulating lignin biosynthesis under nitrogen-luxury conditions. *Mol Plant*, 2018, 11: 806–814
 - 64 Dettmer J, Elo A, Helariutta Y. Hormone interactions during vascular development. *Plant Mol Biol*, 2009, 69: 347–360
 - 65 Cecchetti V, Altamura M M, Brunetti P, et al. Auxin controls *Arabidopsis* anther dehiscence by regulating endothecium lignification and jasmonic acid biosynthesis. *Plant J*, 2013, 74: 411–422
 - 66 Ghelli R, Brunetti P, Napoli N, et al. A newly identified flower-specific splice variant of auxin response factor8 regulates stamen elongation and endothecium lignification in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2018, 30: 620–637
 - 67 Zhang K, Novak O, Wei Z, et al. *Arabidopsis* ABCG14 protein controls the acropetal translocation of root-synthesized cytokinins. *Nat Commun*, 2014, 5: 3274
 - 68 Eriksson M E, Israelsson M, Olsson O, et al. Increased gibberellin biosynthesis in transgenic trees promotes growth, biomass production and xylem fiber length. *Nat Biotechnol*, 2000, 18: 784–788
 - 69 Ragni L, Nieminen K, Pacheco-Villalobos D, et al. Mobile gibberellin directly stimulates *Arabidopsis* hypocotyl xylem expansion. *Plant Cell*, 2011, 23: 1322–1336
 - 70 Mauriat M, Sandberg L G, Moritz T. Proper gibberellin localization in vascular tissue is required to control auxin-dependent leaf development and bud outgrowth in hybrid aspen. *Plant J*, 2011, 67: 805–816
 - 71 Wang G L, Que F, Xu Z S, et al. Exogenous gibberellin enhances secondary xylem development and lignification in carrot taproot. *Protoplasma*, 2017, 254: 839–848
 - 72 Tokunaga N, Uchimura N, Sato Y. Involvement of gibberellin in tracheary element differentiation and lignification in *Zinnia elegans* xylogenic culture. *Protoplasma*, 2006, 228: 179–187
 - 73 Denis E, Kbir N, Mary V, et al. *WOX14* promotes bioactive gibberellin synthesis and vascular cell differentiation in *Arabidopsis*. *Plant J*, 2017, 90: 560–572
 - 74 Rao X, Shen H, Pattathil S, et al. Dynamic changes in transcriptome and cell wall composition underlying brassinosteroid-mediated lignification of switchgrass suspension cells. *Biotechnol Biofuels*, 2017, 10: 266
 - 75 Zhang X, Gou M, Liu C J. *Arabidopsis* Kelch repeat F-box proteins regulate phenylpropanoid biosynthesis via controlling the turnover of phenylalanine ammonia-lyase. *Plant Cell*, 2013, 25: 4994–5010
 - 76 Cheng S H, Sheen J, Gerrish C, et al. Molecular identification of phenylalanine ammonia-lyase as a substrate of a specific constitutively active *Arabidopsis* CDPK expressed in maize protoplasts. *FEBS Lett*, 2001, 503: 185–188
 - 77 Wang J P, Chuang L, Loziuk P L, et al. Phosphorylation is an on/off switch for 5-hydroxyconiferaldehyde *O*-methyltransferase activity in poplar monolignol biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: 8481–8486
 - 78 Bonawitz N D, Kim J I, Tobimatsu Y, et al. Disruption of mediator rescues the stunted growth of a lignin-deficient *Arabidopsis* mutant. *Nature*, 2014, 509: 376–380
 - 79 Anderson N A, Bonawitz N D, Nyffeler K, et al. Loss of ferulate 5-hydroxylase leads to mediator-dependent inhibition of soluble phenylpropanoid biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2015, 169: 1557–1567
 - 80 Kim J I, Dolan W L, Anderson N A, et al. Indole glucosinolate biosynthesis limits phenylpropanoid accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 2015, 27: 1529–1546
 - 81 Chezem W R, Memon A, Li F S, et al. SG2-Type R2R3-MYB transcription factor MYB15 controls defense-induced lignification and basal immunity in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2017, 29: 1907–1926
 - 82 Kondo Y, Nurani A M, Saito C, et al. Vascular cell induction culture system using *Arabidopsis* leaves (visual) reveals the sequential differentiation of sieve element-like cells. *Plant Cell*, 2016, 28: 1250–1262
 - 83 Kondo Y. Reconstitutive approach for investigating plant vascular development. *J Plant Res*, 2018, 131: 23–29
 - 84 Wang Y T, Xu Z D, Peng L C. Research progress in the groove structures of plant cell walls and biomass utilizations (in Chinese). *Sci Sin Vitae*, 2014, 44: 766–774 [王艳婷, 徐正丹, 彭良才. 植物细胞壁沟槽结构与生物质利用研究展望. 中国科学: 生命科学, 2014, 44: 766–774]
 - 85 He X Q, Wang Y Q, Hu Y X, et al. Ultrastructural study of secondary wall formation in the stem fiber of *Phyllostachys pubescens* (in Chinese). *Bull Bot*, 2000, 42: 1003–1008 [贺新强, 王幼群, 胡玉熹, 等. 毛竹茎纤维次生壁形成过程的超微结构观察. 植物学报, 2000, 42: 1003–1008]
 - 86 Gierlinger N, Schwanninger M. Chemical imaging of poplar wood cell walls by confocal Raman microscopy. *Plant Physiol*, 2006, 140: 1246–

1254

- 87 Min W, Freudiger C W, Lu S, et al. Coherent nonlinear optical imaging: Beyond fluorescence microscopy. *Annu Rev Phys Chem*, 2011, 62: 507–530
- 88 Zeng Y, Saar B G, Friedrich M G, et al. Imaging lignin-downregulated Alfalfa using coherent anti-stokes Raman scattering microscopy. *Bioenerg Res*, 2010, 3: 272–277
- 89 Freudiger C W, Min W, Saar B G, et al. Label-free biomedical imaging with high sensitivity by stimulated Raman scattering microscopy. *Science*, 2008, 322: 1857–1861
- 90 Xia Y, Chen T Y, Wen J L, et al. Multi-analysis of chemical transformations of lignin macromolecules from waterlogged archaeological wood. *Int J Biol Macromol*, 2018, 109: 407–416
- 91 Saar B G, Freudiger C W, Reichman J, et al. Video-rate molecular imaging *in vivo* with stimulated Raman scattering. *Science*, 2010, 330: 1368–1370
- 92 Wu H, Xu H, Li H, et al. Seasonal development of cambial activity in relation to xylem formation in Chinese fir. *J Plant Physiol*, 2016, 195: 23–30
- 93 Xu H M, Wang L, Cao D C, et al. Research progress on the regulation of cambium activity periodicity (in Chinese). *Chin Sci Bull*, 2015, 60: 619–629 [许会敏, 王莉, 曹德昌, 等. 维管形成层活动周期调控研究进展. 科学通报, 2015, 60: 619–629]
- 94 Zhao Y, Lin S, Qiu Z, et al. MicroRNA857 is involved in the regulation of secondary growth of vascular tissues in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2015, 169: 2539–2552
- 95 Man Y, Zhao Y, Ye R, et al. *In vivo* cytological and chemical analysis of Casparian strips using stimulated Raman scattering microscopy. *J Plant Physiol*, 2018, 220: 136–144
- 96 Zhao Y, Man Y, Wen J, et al. Advances in imaging plant cell walls. *Trends Plant Sci*, 2019, 24: 867–878
- 97 Gorzsás A, Stenlund H, Persson P, et al. Cell-specific chemotyping and multivariate imaging by combined FT-IR microspectroscopy and orthogonal projections to latent structures (OPLS) analysis reveals the chemical landscape of secondary xylem. *Plant J*, 2011, 66: 903–914
- 98 Cao C, Yang Z, Han L, et al. Study on in situ analysis of cellulose, hemicelluloses and lignin distribution linked to tissue structure of crop stalk internodal transverse section based on FTIR microspectroscopic imaging. *Cellulose*, 2015, 22: 139–149
- 99 Gierlinger N, Keplinger T, Harrington M. Imaging of plant cell walls by confocal Raman microscopy. *Nat Protoc*, 2012, 7: 1694–1708

Plant lignification and its regulation

GUO YaYu^{1,2}, XU HuiMin³, ZHAO YuanYuan^{1,2}, WU HongYang^{1,2} & LIN JinXing^{1,2}

¹ Beijing Advanced Innovation Center for Tree Breeding by Molecular Design, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China;

² College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China;

³ College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100193, China

Lignification is a complex and dynamic process with lignin deposited in the cell wall, which can maintain central role in higher plant development and enhance resistance to various biotic and abiotic stresses. As plant cell wall is the most abundant renewable energy sources on the earth and lignification is a crucial developmental process, therefore research focusing on this process has important theory significance and practice value. This review summarized lignin composition, lignified cell types and the biosynthesis pathway, then focused on recent progress in the regulation of plant lignification, including transcriptional regulation, microRNA, hormone and environmental factors, new induction systems of lignification, and imaging technologies. This will provide insights into molecular mechanisms in lignification and theoretical basis for exploration and utilization of lignin bioengineering.

lignification, lignin, cell wall, regulation mechanism

doi: [10.1360/SSV-2019-0204](https://doi.org/10.1360/SSV-2019-0204)