

## 细胞分裂素氧化酶/脱氢酶的生理生化和分子特性

张芬, 郭得平\*, 林明丽, 闫淼淼

浙江大学农业与生物技术学院园艺系, 杭州 310029

### Physiological, Biochemical and Molecular Properties of Cytokinin Oxidase/Dehydrogenase

ZHANG Fen, GUO De-Ping\*, LIN Ming-Li, YAN Miao-Miao

Department of Horticulture, College of Agriculture and Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China

摘要: 文章对细胞分裂素氧化酶/脱氢酶(CKX)的结构、生理生化特性、基因功能及表达调控等方面的研究进展作了介绍。

关键词: 细胞分裂素氧化酶/脱氢酶(CKX); 特性; 植物激素; 基因表达

细胞分裂素(cytokinins, CKs)是一类在 $N^6$ 位置上取代的腺嘌呤衍生物,对植物生长发育起重要调节作用。植物细胞内的CKs动态平衡受合成和降解等过程调控。有关CKs合成途径的研究较多,机制较为明确,在此不再赘述。CKs的降解由细胞分裂素氧化/脱氢酶(cytokinin oxidase/dehydrogenase, CKX)催化,CKX是目前已知的惟一的专一催化天然异戊烯类CKs及其核苷的不可逆降解的酶,如异戊烯基腺嘌呤(isopentenyl adenine, iP)、玉米素(zeatin, Z)等及其核苷(邓江明和潘瑞焯 1997)。此酶最早由Paces等(1971)在烟草细胞中发现,之后又相继在玉米、小麦和拟南芥等植物中报道(Armstrong 1994; Galuszka等 2001, 2004)。最近,CKX的研究取得很大进展,本文就其生理生化和分子特性作一介绍。

#### 1 CKX的生化特性

**1.1 CKX的辅酶结构和催化功能** CKX的辅酶结构是其活性的重要基础,也一直是研究的热点。研究发现,玉米 $ZmCKX1$ 基因的氨基酸序列69~105处存在的一个束缚态FAD区域为其辅酶结构,在104~106处存在GHS(Glu-His-Ser)序列模式。CKX酶通过His与FAD共价结合(Hare和Van Staden 1994)。CKX既可以发生氧化作用,也可以在无氧条件下通过电子受体(苯醌)发生脱氢作用。氧化反应对底物特异性要求不严格,能以极低的速率催化芳环侧链的CKs降解,如6-苄基腺嘌呤(6-benzyladenine, 6-BA)。如果有合适的电子受体,CKX会以脱氢的方式发生作用,其高度专一性底物为含有不饱和异戊烯类侧链的CKs。CKX的催化机制可能是:CKs先与FAD形成共价中间产物,随

后中间产物降解成氧化态FAD及亚胺化合物,此化合物进一步水解成腺嘌呤和不饱和醛(3-甲基-2-丁烯醛)(Malito等 2004)。

**1.2 CKX的底物专一性** CKX对CKs有很强的底物专一性,尤其是进行脱氢反应时,一般只能催化 $N^6$ 位置含有不饱和异戊烯类侧链的CKs的降解,不能识别带有饱和侧链[如二氢玉米素(dihydrozeatin, diHZ)、iP]和芳环侧链[如激动素(kinetin, KT)、6-BA]的CKs。因此,iP、Z及其核苷[异戊烯基腺苷(isopentenyladenine riboside, iPR)、玉米素核苷(zeatin riboside, ZR)]是它的底物。在pH 7.0条件下,玉米 $ZmCKX1$ 与iP、反式玉米素(*trans*-Z)和顺式玉米素(*cis*-Z)的 $K_m$ 值分别为1.5、14和46  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,而相应核苷的 $K_m$ 值较高,如iPR为11  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,反式玉米素核苷(*trans*-ZR)为54  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (Bilyeu等 2001)。 $K_m$ 值还与pH值有关,如拟南芥中 $AtCKX2$ 与iPR的 $K_m$ 值在pH 6.5时为40  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ;在pH 9.0时则为15  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (Frebort等 2002)。

CKX与不同底物发生氧化和还原两种反应过程中的亲和力也可能有差异。如 $ZmCKX1$ 与iP发生氧化和还原两种反应时的 $K_m$ 值几乎相等,但 $ZmCKX1$ 与Z、iPR和ZR发生还原反应的 $K_m$ 值比氧化反应高很多(Kopecny等 2005)。

#### 2 CKX的分子结构

单个 $AtCKX$ 活性与CKX酶总活性有很大区别,这种差异可能与CKX的三维结构有关,包括其活性

收稿 2008-05-04 修定 2008-07-01

\* 通讯作者(E-mail: dpguo@zju.edu.cn; Tel: 0571-86971121)。

位点结构和糖基化程度。

**2.1 CKX 的三维结构** 玉米 ZmCKX1 蛋白三维结构包含一个 FAD 结合域和一个底物结合域, 其中 FAD 通过黄素环上的 8-甲基与 His105 结合。X 射线显示催化反应中心由位于蛋白表面的漏斗状区域和黄素环椭圆空洞构成, 两者通过 Asp169、Trp397 和 Leu458 组成入口的窄孔连接。发生反应

时, 异戊烯基腺嘌呤亚胺化化合物的异戊烯基侧链与空洞结合, 而腺嘌呤环则结合在漏斗状区域。一旦结合后此结合体就封住窄孔, 异戊烯基分子紧密结合于紧邻黄素反应位点的 C11 原子而进行氧化作用。除 N1 外, CKs 的其他 N 原子都参与氢键结合, Asp169 的 H 原子在与 N10 原子和 Glu288 侧链结合中起作用(图 1)。Malito 等(2004)的研究表明, CKs

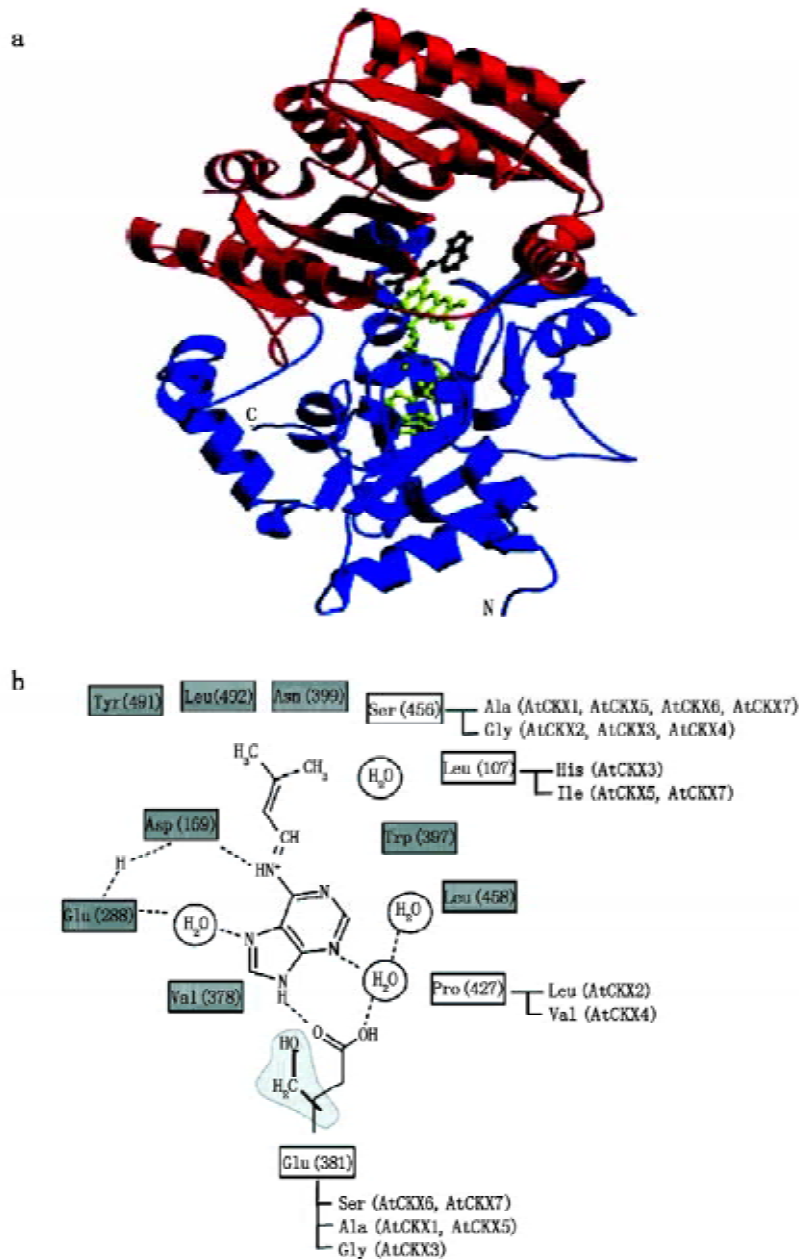


图1 CKX 活性位点的结构

a: 玉米 CKX 单体结构(Malito 等 2004)。FAD 结合域(残基 40~244 和 492~534); 红色部分为底物结合域(残基 245~491); 黄色和黑色部分分别表示 FAD 和氧化的 iPA; N 和 C 分别表示 N 端和 C 残基。b: CKX 底物结合域的分子结构(Galuszka 等 2007)。ZmCKX1 中氧化态 iPA 结合区周围的氨基酸残基是高度保守的, 但在拟南芥基因家族中个别氨基酸残基有差异。灰色方框表示的是 ZmCKX1 完全保守氨基酸残基。

的胺基与Asp-Glu之间的极性氢键利于氧化反应进行,在三维结构图中未发现CKX活性部位的O<sub>2</sub>运输通道以及电子受体(如FAD分子附近的苯醌)的结合部位。这表明黄素通过蛋白将电子传到蛋白表面的电子受体上。

**2.2 CKX蛋白的分子结构特征及基因保守区** 不同植物中的CKX酶有一定的差异,其分子量范围在25.1~94.4 kDa之间(Jones等1992)。CKX分子量的差异可能由转译后的糖基化修饰引起,糖基化利于CKX酶转运、定位和蛋白稳定。如玉米CKX酶约有8个糖基化位点,每个糖基化位点平均有10个己糖分子(Schmulling等2003)。并非所有的CKX都被糖基化,如烟草和菜豆属植物中糖基化与未糖基化CKX的最适pH存在差异,这表明糖基化差异可能与CKX酶定位有关(Kaminek和Armstrong 1990; Motyka等2003)。玉米ZmCKX1酶有4个糖基化位点和5个糖残基。其中3个糖残基分别与Asn63、Asn89和Asn294结合,另2个残基侧链与Asn134相连(Malito等2004)。Kopečný等(2005)报道去糖基化的CKX可保持原酶的大部分活性。

虽然不同来源的CKX结构有差异,但它们约有1/3的氨基酸序列高度保守。原核生物保守区大多位于束缚态FAD区域,在Motif的N端和C端存在高度保守的短序列,其序列390附近包含GIWeVPHWLN模式 and C端的PGQxIF信号(Schmulling等2003)(图1-b)。保守区序列变化幅度很大,表明保守的氨基酸在功能上起作用,其中有些序列可能是CKX所特有的,它们可能在底物识别和电子链传递中起作用。高等植物的CKX基因保守区中常含有2~4个内含子,如玉米和兰花有4个基因含2或3个内含子,而杜鹃花、低等生物念珠藻属CKX基因中则没有内含子(Schmulling等2003)。

### 3 CKX基因家族

迄今为止,已经鉴定出多个CKX编码基因的完全序列和表达序列标签。玉米ZmCKX基因家族至少有5个成员(ZmCKX1~ZmCKX5),它们均在玉米粒的早期发育过程中起作用,其中ZmCKX1是重要的一员,也是首个得到克隆的CKX基因(Massonneau等2004)。目前已知拟南芥有7个CKX基因(*AtCKX1~AtCKX7*)。其中*AtCKX2*和*AtCKX4*紧密相连,它们可能与复制相关。*AtCKX7*基因序

列与拟南芥其他CKX蛋白的相似性很小(Schmulling等2003)。拟南芥*AtCKX*蛋白间氨基酸序列同源性在34.3%~65.9%之间,而*AtCKX*与ZmCKX蛋白氨基酸序列同源性在34.5%~44.9%之间。水稻*OsCKX*基因组至少有11个成员(*OsCKX1~OsCKX11*)(Werner等2006)。其中*OsCKX4*和*OsCKX5*与拟南芥CKX蛋白的联系比与水稻其他蛋白的联系更密切,这说明同一物种中CKX基因的分离先于不同物种的分离。此外,在大麦、兰花、棉花、豌豆和小麦等植物中也克隆出CKX基因(Bilyeu等2001; Schmulling等2003; Yang等2003; Galuszka等2004; Massonneau等2004; Feng等2008)。低等生物念珠藻(*Nostoc* sp. PCC 7120)也存在CKX基因(*NsCKX1*),其与植物CKX仅有16%~22%的同源性,在CKs分解代谢中的功能还不明确(Kaneko等2001)。

把拟南芥7个CKX基因(*AtCKX1~AtCKX7*)分别转入烟草植物后,以异戊烯类CKs为底物时只有*AtCKX2*和与其关系最密切的*AtCKX4*基因的酶活性很高,其活性与ZmCKX1相当。其他*AtCKX*(*AtCKX1*、*AtCKX3*、*AtCKX5*、*AtCKX6*和*AtCKX7*)也具有CKX活性,但其催化速率比*AtCKX2*和*AtCKX4*低很多。所有7个*AtCKX*酶均以脱氢而不是氧化的方式发生作用。这些差异可能是由于CKX的结构多样性而导致电子传递受体这一过程产生差异所致(Galuszka等2007)。转*AtCKX*启动子-*GUS*融合基因表达分析表明基因家族各个成员在根与茎部的表达有差异,其功能重叠很少,表明不同生长阶段的不同CKX酶的功能不同(Werner等2003)。目前植物中的主要CKX分支关系已基本明确(图2)。

## 4 CKX基因的功能及其表达调控

**4.1 CKX基因的生理作用** CKX在调控植物生长发育进程中作用的报道较少,目前在一些方面已取得了一定的进展。

谷类种子发育过程中CKX活性及作用研究得较为清楚。在发育的小麦种子中最高CKs含量与高CKX活性相关,然后在苗期CKs含量和CKX活性不断下降(Galuszka等2001)。玉米生长发育过程中CKX活性授粉后最初10~12 d增加9倍,同时其CKs含量也相应增加。授粉20~25 d后,CKX活性与CKs含量达到一个稳定的低水平状态。而

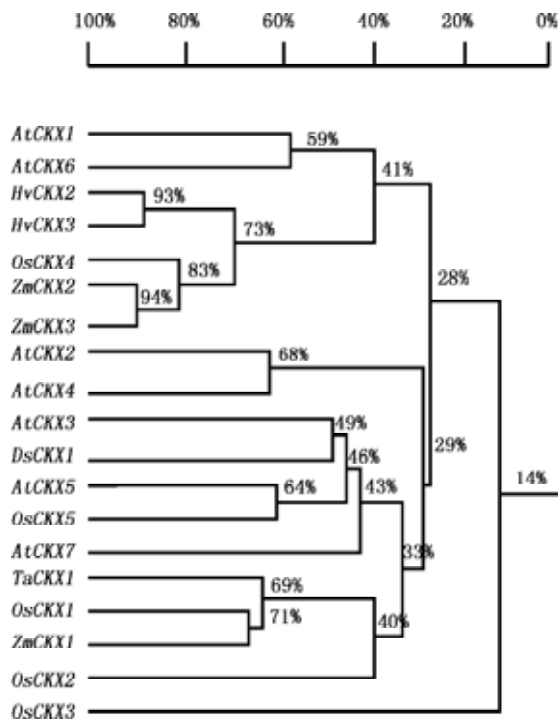


图2 CKX基因的系统分支(Feng等2008)  
聚类图上的数字表示各个基因序列的相似度。

且,玉米穗顶部籽粒的缺失和胁迫导致的结穗减少现象可以用CKs处理得到改善。发育中的玉米粒胚胎内CKX可通过抑制CKs水平而抑制种子提早萌芽;玉米中CKX的另一个作用是保护粒穗不受真菌病原体入侵,它通过降解真菌中CKs的产生来实现(Bilyeu等2001)。但发育中的玉米粒不同组织的CKs含量和CKX活性有显著差别。CKs水平和CKX活性在发育的玉米花梗/胎座中都很高,但二者在胚乳中却较低;而果皮与胚中的CKX活性比胚乳中的高,它们的CKs水平较低。因此,细胞外CKX的作用之一可能是调节外源CKs向植物组织输入,如库组织中CKs输入可能经过质外体,此部位的CKX可能调节CKs水平(Jones等1992)。

细胞外CKX的另一个作用可能是降解细胞周期产生的CKs。在细胞周期中CKs含量短时间内迅速增加,目前还不清楚其含量水平是如何迅速增加的。细胞周期相关的CKs向细胞外运输必须在其降解之前进行,CKX蛋白可能参与此过程。分裂细胞可能通过向外运输CKs向其相邻细胞传达细胞正在分裂这一信号。也许在细胞分裂区,细胞外CKX作为相邻细胞产生的CKs的保护者以保证每个细胞能够独立产生CKs。这表明细胞分裂期

每个细胞产生CKs为本细胞独用。而且,CKX降解细胞外CKs,使其CKs感受系统恢复到原始水平。在细胞周期进程中,CKX活性随着有丝分裂G<sub>1</sub>/S和S/G<sub>2</sub>转变期出现的最高内源CKs浓度的变化而有规律地变化。CKs含量和CKX活性同时增加,表明CKs通过其自身快速降解而调控细胞周期(Hartig和Beck2005)。

CKX还参与植物衰老过程。相对于幼嫩叶片而言,烟草老叶片中CKX活性较低,CKs的降解能力也较低,这表明CKs降解力增强并不直接参与叶片有序衰老的调控过程(Werner等2003)。但*AtCKX5*在拟南芥衰老叶片中过量表达后会导致CKs含量降低(Werner等2006)。大麦叶片CKX活性可被外施KT大大提高,并且衰老期间无论是否存在KT,CKX糖基化/未糖基化比例都提高(Conrad等2007)。

CKX可能在线粒体和叶绿体中发挥作用,尽管其中具体作用机制尚不清楚。线粒体中CKs的功能了解甚少,线粒体呼吸链的部分能量产生系统由CKs控制。但对CKs启动叶绿体相关的反应了解较清楚,包括脱黄化现象及叶绿体蛋白编码基因的调控。叶绿体蛋白质提取物含有相对较高的CKX活性(Benkova等1999)。目前仍不清楚的是CKX是否存在于叶绿体上。

转CKX基因可用来验证细胞内外CKs在调节植物发育中的不同功能。在转CKX基因苔藓植物中,细胞外iP和iPR浓度显著降低,但其细胞内CKs含量变化不大,而CKX活性大幅增加。对野生型植株和转CKX基因植株的分析表明,细胞外iP和iPR是诱导苔藓植物芽形成的主要CKs(Schwartzenberg等2007)。CKX基因过量表达植株的一些性状变化明显,如芽形成减少或缓慢、丧失有性繁殖功能和产生不正常的丝状体细胞。

转*AtCKX*基因植物表现出CKX活性增强和CKs浓度降低,随之引起植物茎生长受抑制。转*AtCKX1*或*AtCKX3*烟草植株的CKX活性比野生型增加3倍,茎生长受到强烈抑制。*AtCKX2*和*AtCKX4*基因过量表达后,CKX活性增加约10倍,但对茎生长的抑制不明显(Werner等2003)。这种茎生长抑制程度差异的原因可能与CKX亚细胞定位或其底物特异性有关。相对于茎生长受抑制而言,转*AtCKX*基因植物的根生长会大大促进。CKs

在根分枝和不定根形成等生长发育中起负调控作用。CKs 缺乏会促进植物根生长和分枝, 根中 CKs 的一个作用是调节分生组织细胞转变为其他细胞; 另一个作用是抑制根原基的形成。CKs 含量长期增加会抑制拟南芥初生根的伸长, 因为它会破坏生长素在侧根原基中的分配规律, 干扰生长素极性运输, 减缓根原基的发育(Kuderova 等 2008)。CKs 受体突变体会促进拟南芥根的生长, 表明胁迫条件下 CKs 增加对根形成不利(Riefler 等 2006)。目前, 关于 CKX 基因与植物根生长关系的研究越来越多, CKX 在调控初生根诱导及发育中所起的作用越来越受重视。转 *AtCKX* 基因烟草的根鲜重增加约 60%, 主要由于根分生组织分化细胞数量增加, 从而导致初生根数量增加(Werner 等 2001)。侧根原基中 *AtCKX* 的激活会促进侧根的形成(Laplaze 等 2007)。

此外, CKX 通过调节 CKs 含量水平成为影响豌豆根瘤形成的关键因素。豌豆根瘤突变体 R50 的根瘤形成较少, 这与其营养器官中 CKs 含量提高有关。分析表明, 其成熟茎和根瘤中的 *PsCKX* 活性比野生型的显著下降, CKs 含量增加, 因而根瘤形成异常(Held 等 2008)。但进一步研究表明, 根瘤形成突变体 R50 中 *PsCKX1* 和 *PsCKX2* 基因表达被上调, 这可能用来补偿其体内 CKX 的缺乏。

研究表明, CKX 通过对植物形态建成的调节而影响植物生产力。如水稻 *OsCKX2* 基因表达降低会引起花序组织中 CKs 积累, 从而促进籽粒数增加, 导致产量提高(Ashikari 等 2005)。

## 4.2 CKX 基因表达调节

### 4.2.1 CKX 基因表达的组织特异性

每个 CKX 基因都有其特有功能, 如拟南芥不同的 CKX 蛋白在亚细胞水平上定位不同, *AtCKX1*~*AtCKX6* 蛋白合成后通常进入内质网。在亚细胞水平上, *AtCKX1* 和 *AtCKX3* 蛋白定位于液泡膜, *AtCKX2* 蛋白仍存在于内质网, 也可能会进入质外体。CKX 基因表达还呈现组织特异性, 拟南芥茎尖大量表达的 *AtCKX1* 和 *AtCKX2* 均可抑制幼嫩组织细胞的生长; *AtCKX4* 在托叶、气孔及根冠中强烈表达; *AtCKX5* 在根分生组织中表达; *AtCKX6* 在雌蕊的发育过程中表达(Werner 等 2003, 2006)。*AtCKX7* 有可能存在于细胞中, 其蛋白的 N 端终止序列没有信号肽。玉米 *ZmCKX1* 基因在籽粒中表达最高, 授粉后 11 d 内达

到高峰, 而 *ZmCKX2*~*ZmCKX5* 主要在营养体组织中表达(Massonneau 等 2004)。大麦 *HvCKX1* 存在于所有的器官组织中, 而 *HvCKX2* 在 7 d 苗龄的幼叶中表达(Galuszka 等 2004)。

### 4.2.2 植物激素对 CKX 基因表达的调节

在外界信号刺激下, 激素之间的互作和平衡可通过激素代谢基因的转录调控实现。*AtCKX* 启动子-*GUS* 标记表明, CKs 会使 CKX 基因表达区域扩大, 如 CKs 处理可使 *AtCKX5-GUS* 表达部位从叶柄延伸到叶片, *AtCKX6-GUS* 活性从根分生组织的维管束扩展到中柱(D'Agostino 等 2000)。CKX 对 CKs 平衡的调控是负反馈机制, 它也负向调控 CKs 合成, 如外施  $10^{-4}$  mol·L<sup>-1</sup> KT 会大幅度提高大麦叶片 CKX 活性(Conrad 等 2007)。

CKs 还可与其他激素互作共同调节植物生长发育。增加内源或外源生长素时, 植物体内 CKs 水平下降, 这可能与生长素抑制 CKs 合成或者 CKX 活性提高后促进其降解有关, 如在离体条件下萘乙酸(naphthylacetic acid, NAA)可增强 CKX 活性。生长素对不同 *AtCKX* 基因表达的影响不同, 其对 *AtCKX2*、*AtCKX4* 和 *AtCKX7* 转录产物有微弱下调(Goda 等 2004)。与此不同的是, 吲哚乙酸(indoleacetic acid, IAA)可提高 *AtCKX1* 和 *AtCKX6* 基因的表达水平 2.9 和 7.9 倍(Werner 等 2006)。

赤霉素(gibberellic acid, GA<sub>3</sub>)对 *AtCKX* 基因转录的影响不大, 但 GA 合成抑制剂如多效唑(paclbutrazol, PP<sub>333</sub>)会降低 *AtCKX3*、*AtCKX4* 和 *AtCKX6* 的转录水平(Werner 等 2006)。脱落酸(abscisic acid, ABA)对 *AtCKX1*、*AtCKX3*、*AtCKX4* 和 *AtCKX6* 基因表达有下调作用。*AtCKX* 基因的表达还会受茉莉酸(jasmonic acid, JA)和表油菜素内酯(epi-brassinolide, epi-BR)的影响。这些结果表明 *AtCKX* 基因的表达调控与植物激素间的互作有关系。

## 5 结语

CKs 几乎参与调控了植物所有的生长发育过程, 特别是细胞分裂与分化过程, 如参与配子细胞与胚胎发育、促进芽的分化、参与根的形态建成、延缓叶片衰老、调控顶端优势、促进维管束形成、促进叶绿体成熟等(黄升谋等 2007; Armstrong 1994)。CKX 是目前所知的惟一的降解 CKs 的关键酶, 它通过调节植物体内 CKs 水平而参

与调控植物的生长发育过程。

*CKX* 基因是研究 CKs 功能的一种有力工具。如通过筛选和分析 *CKX* 基因突变体可以帮助了解各个 *CKX* 基因的作用; 用 *CKX* 转基因植物利于阐明 CKs 和 *CKX* 基因的关系及其生理作用; 分析 *CKX* 基因在组织和不同发育阶段的表达查明具体组织器官中 CKs 的功能等。

鉴定并利用重要的农艺基因是作物育种的一个有效途径。在植物基因组中发现隐藏着的有用基因来改善农艺性状是植物育种的新方法。近年来对 *CKX* 的研究不仅加深了其在调节植物发育机制方面的了解, 而且发现通过调节 *CKX* 基因表达可提高水稻产量。由于该策略是一种环境友好、不需要外界高投入、效率高的改良作物性状的手段, 因此, Ashikari 等(2005)预测 *CKX* 基因将对“新的绿色革命”做出重大贡献。此外, 研究水稻、玉米、小麦等禾本科作物中 *CKX* 基因功能及其作用机制对于抗逆性等重要农艺性状改良也有意义。

### 参考文献

- 邓江明, 潘瑞焱(1997). 细胞分裂素氧化酶. 植物生理学通讯, 33 (5): 370~375
- 黄升谋, 邹应斌, 敖和军(2007). 植物激素与谷类作物籽粒发育. 植物生理学通讯, 43 (1): 184~188
- Armstrong DJ (1994). Cytokinin oxidase and the regulation of cytokinin degradation. In: Mok DWS, Mok MC (eds). Cytokinins: Chemistry, Activity and Function. Boca Raton: CRC, 139~154
- Ashikari M, Sakakibara H, Lin SY, Yamamoto T, Takashi T, Nishimura A, Angeles ER, Qian Q, Kitano H, Matsuoka M (2005). Cytokinin oxidase regulates rice grain production. *Science*, 309: 741~745
- Benkova E, Witters E, Van Dongen W, Kolar J, Motyka V, Brzobohat B, Van Onckelen HA, Machakova I (1999). Cytokinins in tobacco and wheat chloroplasts: occurrence and changes due to light/dark treatment. *Plant Physiol*, 121: 245~251
- Bilyeu KD, Cole JL, Laskey JG, Riekhof WR, Esparza TJ, Kramer MD, Morris RO (2001). Molecular and biochemical characterization of a cytokinin oxidase from maize. *Plant Physiol*, 125: 378~386
- Conrad K, Motykal V, Schluter T (2007). Increase in activity, glycosylation and expression of cytokinin oxidase/dehydrogenase during the senescence of barley leaf segments in the dark. *Plant Physiol*, 130: 572~579
- D'Agostino IB, Deruere J, Kieber JJ (2000). Characterization of the response of the *Arabidopsis* response regulator gene family to cytokinin. *Plant Physiol*, 124: 1706~1717
- Feng DS, Wang HG, Zhang XS, Kong LR, Tian JC, Li XF (2008). Using an inverse PCR method to clone the wheat cytokinin oxidase/dehydrogenase gene *TaCKX1*. *Plant Mol Biol Rep*, 26: 143~155
- Frebort I, Sebela M, Galuszka P, Werner T, Schmullig T, Pec P (2002). Cytokinin oxidase/cytokinin dehydrogenase assay: optimized procedures and applications. *Anal Biochem*, 306: 1~7
- Galuszka P, Frebort I, Ebela M, Sauer P, Jacobsen S, Pe P (2001). Cytokinin oxidase or dehydrogenase? Mechanism of cytokinin degradation in cereals. *Eur J Biochem*, 268: 450~461
- Galuszka P, Frebortova J, Werner T, Yamada M, Strnad M, Schmullig T, Frebort I (2004). Cytokinin oxidase/dehydrogenase genes in barley and wheat: cloning and heterologous expression. *Eur J Biochem*, 271: 3990~4002
- Galuszka P, Popelkova H, Werner T, Frebortova J, Pospisilova H, Mik V, Kollmer I, Schmullig T, Frebort I (2007). Biochemical characterization of cytokinin oxidases/dehydrogenases from *Arabidopsis thaliana* expressed in *Nicotiana tabacum* L. *J Plant Growth Regul*, 26: 255~267
- Goda H, Sawa S, Asami T, Fujioka S, Shimada Y, Yoshida S (2004). Comprehensive comparison of auxin-regulated and brassinosteroid-regulated genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 134: 1555~1573
- Hare PD, van Staden J (1994). Cytokinin oxidase: biochemical features and physiological significance. *Physiol Plant*, 91: 128~136
- Hartig K, Beck E (2005). Endogenous cytokinin oscillations control cell cycle progression of tobacco BY-2 cells. *Plant Biol*, 7: 33~40
- Held M, Pepper AN, Bozdarov J, Smith MD, Emery RJN, Guinel FC (2008). The pea nodulation mutant R50 (*sym16*) displays altered activity and expression profiles for cytokinin dehydrogenase. *J Plant Growth Regul*, 27: 170~180
- Jones RJ, Schreiber BMN, McNeil K, Brenner ML, Foxon G (1992). Cytokinin levels and oxidase activity during maize kernel development. In: Kaminek M, Mok DWS, Zazimalova E (eds). *Physiology and Biochemistry of Cytokinins in Plants*. The Hague: SPB Academic Publishing, 235~239
- Kaminek M, Armstrong DJ (1990). Genotypic variation in cytokinin oxidase from *Phaseolus* callus cultures. *Plant Physiol*, 93: 1530~1538
- Kaneko T, Nakamura Y, Wolk CP, Kuritz T, Sasamoto S, Watanabe A, Iriguchi M, Ishikawa A, Kawashima K, Kimura T et al (2001). Complete genomic sequence of the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *DNA Res*, 8 (supp): 205~213
- Kopecny D, Pethe C, Sebela M, Houba-Herlin N, Madzak C, Majira A, Laloue M (2005). High-level expression and characterization of *Zea mays* cytokinin oxidase/dehydrogenase in *Yarrowia lipolytica*. *Biochimie*, 87: 1011~1022
- Kuderova A, Urbankova I, Valkova M, Malbeck J, Brzobohaty B, Nemethova D, Hejatko J (2008). Effects of conditional IPT-dependent cytokinin overproduction on root architecture of *Arabidopsis* seedlings. *Plant Cell Physiol*, 49: 570~582
- Laplaze L, Benkova E, Casimiro I, Maes L, Vannest S, Swarup R,

- Weijers D, Calvo V, Parizot B, Herrera-Rodriguez BM et al (2007). Cytokinins act directly on lateral root founder cells to inhibit root initiation. *Plant Cell*, 19: 3889~3900
- Malito E, Coda A, Bilyeu KD, Fraaije MW, Mattevi A (2004). Structures of Michaelis and product complexes of plant cytokinin dehydrogenase: implications for flavoenzyme catalysis. *J Mol Biol*, 341: 1237~1249
- Massonneau A, Houba-Herlin N, Pethe C, Madzak C, Falque M, Mercy M, Kopečný D, Majira A, Rogowsky P, Laloue M (2004). Maize cytokinin oxidase genes: differential expression and cloning of two new cDNAs. *J Exp Bot*, 55: 2549~2557
- Motyka V, Váková R, Čapková V, Petrásek J, Kaminek M, Schmulling T (2003). Cytokinin-induced upregulation of cytokinin oxidase activity in tobacco includes changes in enzyme glycosylation and secretion. *Physiol Plant*, 117: 11~21
- Paces V, Werstiuk E, Hall RH (1971). Conversion of  $N^6$ -( $\Delta^2$ -isopentenyl)adenosine to adenosine by enzyme activity in tobacco tissue. *Plant Physiol*, 48: 775~778
- Riefler M, Novak O, Strnad M, Schmulling T (2006). *Arabidopsis* cytokinin receptor mutants reveal functions in shoot growth, leaf senescence, seed size, germination, root development, and cytokinin metabolism. *Plant Cell*, 18: 40~54
- Schmulling T, Werner T, Riefler M, Krupkova E, Bartrina y Manns I (2003). Structure and function of cytokinin oxidase/dehydrogenase genes of maize, rice, *Arabidopsis* and other species. *J Plant Res*, 116: 241~252
- von Schwartzenberg K, Nunez MF, Blaschke H, Dobrev PI, Novak O, Motyka V, Strnad M (2007). Cytokinins in the bryophyte *Physcomitrella patens*: analyses of activity, distribution and cytokinin oxidase/dehydrogenase overexpression reveal the role of extracellular cytokinins. *Plant Physiol*, 145: 786~800
- Werner T, Kollmer I, Bartrina I, Holst K, Schmulling T (2006). New insights into the biology of cytokinin degradation. *Plant Biol*, 8: 371~381
- Werner T, Motyka V, Laucou V, Smets R, Van Onckelen H, Schmulling T (2003). Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *Plant Cell*, 15: 2532~2550
- Werner T, Motyka V, Strnad M, Schmulling T (2001). Regulation of plant growth by cytokinin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 10487~10492
- Yang SH, Yu H, Goh CJ (2003). Functional characterization of a cytokinin oxidase gene *DSCKX1* in *Dendrobium* orchid. *Plant Mol Biol*, 51: 237~248