

细胞分裂素的生物合成及信号途径的研究进展

柴娟 (兰州大学生命科学学院, 细胞生物所, 甘肃兰州 730000)

摘要 主要对细胞分裂素的生物合成及信号途径进行系统阐述。

关键词 细胞分裂素; 生物合成; 信号途径

中图分类号 S143.8 文献标识码 A 文章编号 0517 - 6611(2008) 10 - 03985 - 05

Studying Progress of the Biosynthesis and Signal Pathway of Cytokinin

CHAI Juan (Institute of Cell Biology, College of Life Science, Lanzhou University, Lanzhou, Gansu 730000)

Abstract The biosynthesis and signal pathway of cytokinin systematically mainly were expounded mainly.

Key words Cytokirins; Biosynthesis; Signal pathway

细胞分裂素是一类较活跃的植物激素, 不仅能促进植物细胞的分裂和扩大, 而且在诱导芽分化、叶绿体发育、运输和分配养分、植物抗衰老等方面都扮演了重要角色。早在 20 世纪 50 年代, 已发现将酵母提取液加入烟草组织培养可以促进髓的分裂, 并且证明是 DNA 降解产物 N⁶- 咪 甲基氨基 呤(KT, kinetin) 的作用^[1]。随后, Skoog 与 Miller 发现, 在未分化的愈伤组织中加入一定比例的细胞分裂素与生长素, 才可以培养为根茎, 就此提出了植物形态发生中生长素- 细胞分裂素假说, 认为细胞分裂素与生长素在植物形态发生中都具有相当重要的作用, 并且共同影响根、茎的形成及之后的生长^[2]。研究表明, 细胞分裂素缺陷株由于顶端分生组织受抑制而导致茎较正常植株矮小, 间隔期延长, 且叶片中细胞分裂素含量仅为野生型的 3% ~ 4%。这表明细胞分裂素对于植物分生组织及形态建成具有重要的调节作用^[3]。

最早发现并纯化的细胞分裂素是 Lethan 于 1963 年报道的从未成熟玉米种子中分离出的反式玉米素(t-Zeatin)^[4]。之后, 发现植物体内存在多种细胞分裂素。从化学角度讲, 细胞分裂分为 2 类: 第一类为 呤型细胞分裂素, 即与天然细胞分裂素相似的取代衍生物, 在腺 呤 N⁶ 位上含有取代基, 一般为类异戊二烯基或者芳香环衍生物侧链, 如 6- 苄基腺 呤(6-benzyladenine, 6-BA)、6- 咪 甲基腺 呤(Kinetin, KI) 等; 另一类为 N, N'- 二苯基脲(DPU) 以及一些苯基脲的衍生物, 又称为苯基脲型细胞分裂素, 包括 N(4- 吡 基) N'- 苯基脲(4PU)、N- 苯基 N'- (2- 氯 4- 吡 基) 脲(4PU30, CPDU)、重氮苯基脲(Thidiazuron, TDZ) 等。笔者对细胞分裂素的生物合成及信号途径进行了系统阐述。

1 生物合成

细胞分裂素一般在年幼器官(如种子、果实、叶片和根尖) 中含量最多。对野生型中 AIPT4 与 AIPT8 进行 RT-PCR 分析发现, AIPT 仅表达于根部, 推测细胞分裂素在体内主要由根部合成, 经木质部运送到地上部分^[5]。利用高效液相色谱(High Performace Liquid Chromatography) - 酶联免疫(Enzyme Linked Immunosorbent Assay, HPLC-ELISA) 的方法分析棕榈树细胞分裂素的分布情况, 发现成熟的花组织、茎尖分生组织(Shoot Apical Meristem, SAM)、幼叶及胚中异戊烯基细胞分裂

素比芳香族细胞分裂素含量高许多, 并且胚中细胞分裂素含量最多, 约为花组织的 2 倍, SAM、幼叶的 5 倍^[6]。

异戊烯基转移酶(Isopentenyl-Transferases, IPT), 也称作细胞分裂素合成酶, 是植物中细胞分裂素合成的限速酶, 以异戊烯基焦磷酸(Isopentenyl Diphosphate, IPP) 为底物, 催化异戊烯基转移到腺苷酸(AMP) N⁶ 位氮原子上, 并且生成异戊烯基腺苷磷酸^[7]。目前, 已研究了几种与细胞分裂素生物合成有关酶的特性, 有些还被纯化并且克隆得到相应的基因^[8]。早在 1978 年, 首次从粘菌(*Dictyostelium discoideum*) 中鉴定出一种酶, 可以催化 AMP 和二甲基丙烯基二磷酸(Dimethylallyl Diphosphate, DMAPP), 使之转化为活性的细胞分裂素——异戊烯基腺苷 5'-磷酸(Isopentenyladenosine-5-Monophosphate, iPMP)^[9]。最早的细胞分裂素转移酶基因是在根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) 中分离得到的, 并命名为 *tmr*^[10]。进一步研究发现, 来源于根癌农杆菌的 *tmr* 基因发生突变时, 将导致植物的根部形成肿瘤。该基因产物与上述酶具有相似的活性, 称之为 IPT 酶。植物组织的粗提物具有 IPT 酶的生理活性^[11]。

现已在多种植物组织的粗提物中检测到 IPT 酶的活性^[10,12]。拟南芥中的 IPT 基因是由一个小的多基因家族编码的, 结构与细胞腺苷酸异戊烯基转移酶、tRNA 异戊烯基转移酶相似。对该基因编码的酶进行生化分析, 结果表明 ADP 与 ATP 是反应的优先底物^[13]。该基因家族包括 9 个成员, 即 AIPT1 ~ AIPT9。除 AIPT2 和 AIPT9 外, 其他 AIPT 基因的重组蛋白能够催化大肠杆菌中活性细胞分裂素的合成^[14]。在酵母(*S. cerevisiae*) 表达载体 PEL61 中克隆拟南芥中与细菌编码异戊烯基转移酶同源的基因, 并且在酵母 ME8 (MOD5 缺失) 突变体中表达, 异戊烯基腺苷(Isopentenyl Adenosine, iPA) 大量积累, 弥补了 MOD5(tRNA_{ipt} 基因) 缺失突变体的抗抑制因子表型^[13], 并且发现几种 AIPT 基因的表达表现出组织特异性^[14]。根据这种表达的特异性, 可以推测细胞分裂素的产生部位可能不尽相同^[15]。筛选分离得到的功能获得突变体 *pga22* 积累了相当高水平的 iPMP 和 iPA, 较野生型增加 19 ~ 38 倍, 能够在缺乏外源细胞分裂素时促进根的形成。分子遗传分析显示, *PGA22* 所编码的即为 AIPT8^[16]。对野生型中 AIPT8 进行 RT-PCR 分析, 发现该基因仅表达于根, 可能参与细胞分裂素在根中的生物合成。

系统进化分析(图 1) 表明, AIPT2 与 AIPT9 相似于 tR-

作者简介 柴娟(1982 -), 女, 甘肃兰州人, 硕士研究生, 研究方向: 拟南芥突变体筛选。

收稿日期 2007-12-17

NAIPT, 而其他 AIPTs 则形成独立分支, 与细菌中 *ipt* 基因同源性更大^[17]。在大肠杆菌中表达这些基因可以诱导细胞分裂素异戊烯基腺嘌呤(Isopentenyl Adenosine) 以及玉米素的分泌^[14]。用花椰菜花叶病毒(Cauliflower Mosaic Virus, CaMV) 35S 启动子过量表达 AIPT4 与 AIPT8 基因, 相同条件下进行愈伤组织培养, 前者在不添加外源细胞分裂素的情况下可以生成茎^[18]; 而 AIPT2 基因只有在培养基中加入细胞分裂素后, 才有茎的再生。但目前尚未在高等植物中发现类似的生物途径。

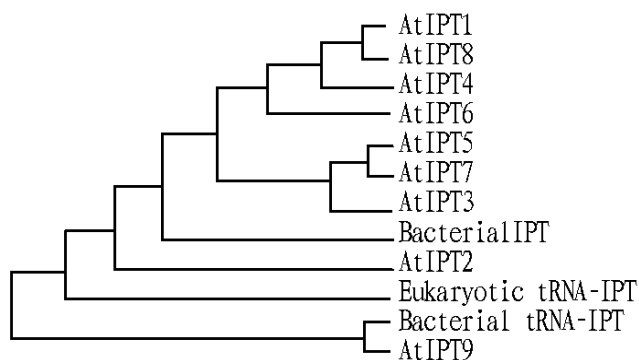


图1 各种异戊烯基转移酶的进化系统树^[10]

Fig.1 The phylogenetic tree of isopentenyl-transferase^[10]

由于细胞分裂素本身为tRNA的组成部分, 最初普遍认为tRNA分解是细胞分裂素合成的一种可能途径^[19]。其水解产物包括顺式-玉米素核苷(cis-zeatinriboside, c-ZR)、反式-玉米素核苷(t-ZR) iPA、甲硫基iPA、顺式-甲硫基ZR及反式-甲硫基ZR。其中,c-ZR为植物tRNA衍生出来的最丰富的细胞分裂素。进一步研究发现,tRNA水解释放出的c-ZR在顺反异构酶的作用下, 可以转化为高活性的t-ZR^[10]。而tRNA中细胞分裂素是否具有活性尚未定论, 且tRNA代谢率极低, 显然不是植物体内高水平的细胞分裂素的主要来源, 同时并非所有的tRNA都可以结合细胞分裂素, 只有以U为起始密码子, 其相对应的tRNA才有可能结合细胞分裂素^[7], 因而tRNA水解释放细胞分裂素的途径是次要的。细胞分裂素的从头合成途径主要有3条。

1.1 AMP途径 一个主要的突破是发现粘菌提取物可以将AMP与DMAPP转化为游离的iPMP及对应的核苷iPA。这一发现推测AMP可能是植物细胞分裂素合成中的底物, 而iPMP是重要介质^[16]。对放射性标记的AMP进行追踪。IPT快速测试法结果显示, 在一系列反应之后AMP融合到iPA^[17]。同时, 在体外条件下, 添加拟南芥中纯化得到的AIPT1可以促进AMP和DMAPP反应, 使DMAPP的异戊烯基侧链转移到AMP的N⁶位点, 合成iPMP。这与细菌中iPMP的合成途径相似^[22]。

1.2 ATP/ADP途径 与细菌IPT酶不同, 拟南芥中纯化得到的AIPT4酶在ATP、ADP和AMP同时存在时并不利用AMP, 而是优先利用ATP和ADP作为底物, 推测该酶可能先合成异戊烯基腺苷5'-三磷酸(Isopentenyladenosine-5-Triphosphate, iPTP)和异戊烯基腺苷5'-二磷酸(Isopentenyladenosine-5-Diphosphate, iPDP), 再经iPTP和iPDP的羟基化转化成玉米素类型的细胞分裂素^[23](图2)。

1.3 旁路途径(Alternative Pathway) AMP曾经被认为是农杆菌中IPT酶的最适腺嘌呤底物^[21], 但在长春花的冠瘿瘤组织中, 以¹⁴C标记腺嘌呤, 并未检测到iPMP的存在, 而ZMP

的含量却相当丰富。进一步研究¹⁴C标记的iPA代谢, 提出iPMP由于迅速转化而导致其含量极低的假设^[24]。以野生型为对照, 对*ipt*基因超量表达植株中细胞分裂素组分进行质谱分析, 发现玉米素核苷(ZR)、玉米素核苷5'-单磷酸(ZMP)水平有所增加, 而iPMP含量未受影响^[25], 甚至有所减少^[26]。这与iPMP是*ipt*基因第一个产物的假说相矛盾。上述*ipt*超表达植株中iPMP的缺乏, 之后由iPMP迅速转化为ZMP的试验结果得到进一步证实^[27]。

*sta*通过对野生型拟南芥及*ipt*转化株中ZMP和iPMP合成速率的比较, 发现ZMP的合成速率比IPT生成iPMP的速率快66倍。进一步研究发现,ZMP的主要前体并非细胞中iPMP, 可以肯定存在一个不依赖iPMP的途径(iPMP-independent Pathway), 即直接将羟基化侧链转移到腺嘌呤N⁶位点上^[5]。推测该途径可能是由AMP与核苷化合物前体直接合成完成的。

2 合成调控

细胞分裂素可能受到植物中多种因素的调节, 并且自身的降解速率、互变途径也在一定程度上对细胞分裂素的合成造成影响^[28]。在矮牵牛(*Petunia hybrida*)中以35S增强子得到的细胞分裂素合成突变体sho表现出细胞分裂素反应中茎的表形, 可能是内源iPA及其衍生物的水平有所增加而导致的^[29]。进一步研究发现, sho编码类似IPT的酶。分离得到的与sho具有相似的表型的拟南芥突变体hoc, 以隐性突变出现, 对其野生型等位基因已经有所研究, 可能对细胞分裂素合成进行反向调节^[30]。

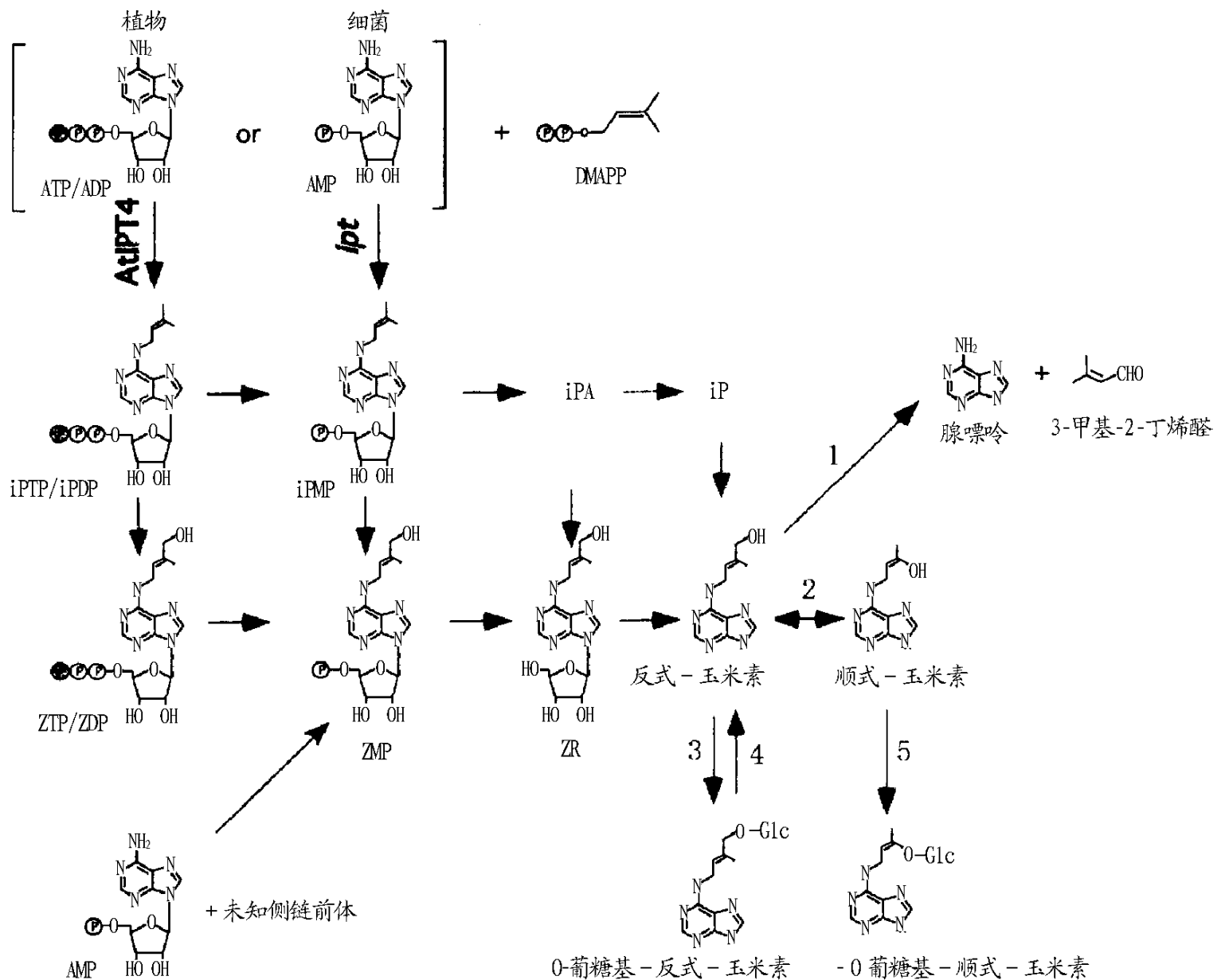
一部分元素会对细胞分裂素的积累造成一定影响。玉米中氮元素可以刺激iPMP的积累, 并且使得Z型细胞分裂素在根部积累。在拟南芥中重新提供硝酸盐时, 细胞分裂素会出现相似的积累^[31]。推测N元素可能诱导植物中细胞分裂素的生物合成, 并且与AIPT基因的表达相关。其他激素也在一定程度上对细胞分裂素进行调控。生长素、细胞分裂素的相互作用主要通过两者参与调节细胞周期组分(Cell Cycle Components)的表达及各自的丰度对植物发育协同调节。例如, 生长素、细胞分裂素对细胞周期调节组分cycD3、cdc2协同调节参与细胞增殖^[32], 并且在AIPT8诱导表达后, 细胞内cycD3的表达也有所增加; 胚轴组织中的细胞分裂素可能通过抑制结合态生长素(IAA-Asp)的形成而提高活性生长素的水平。同时, 生长素通过促进氧化降解和糖苷化降低细胞分裂素的水平。一方面, 生长素可以直接增强细胞分裂素氧化酶的活性, 促进其氧化降解; 另一方面, 生长素或者结合态生长素可以抑制-葡萄糖苷酶活性, -葡萄糖苷酶可以使结合态的细胞分裂素分解, 并且释放出活性形式^[32]。

3 信号途径

为了阐明细胞分裂素的合成、转运以及对植物生长发育的调控机理, 目前主要通过外源激素反应性, 筛选相关基因, 研究激素的信号转导。但由于外源细胞分裂素的添加导致乙烯信号转导途径的激活, 早期筛选得到的数十个“细胞分裂素突变体”并非细胞分裂素信号转导中的特异突变体^[18]。目前已经利用生物化学的方法分离出多种细胞分裂素结合蛋白, 但有关受体功能的研究进展比较缓慢, 推测在细胞分

裂素信号转导途径中主要包括非激素依赖的 CKI1 途径和激素依赖的 CRE1 途径^[33]。这2个途径包括许多富含组氨酸的磷酸基团转移因子以及大量被称作“反应调节子”(Re-

sponse Regulators), 都需要通过一系列由组氨酸(Histidine, Hs)到天冬氨酸(Aspartic Acid, Asp)的磷酸化才可以激活^[34-35]。



注:1. 细胞分裂素氧化酶;2. 顺反异构酶;3. 反式-玉米素-O-葡糖基转移酶;4. -葡糖苷酶;5. 顺式-玉米素-O-葡糖基转移酶;DMAPP: 二甲基丙烯基二磷酸;iPTP: 异戊烯基腺苷5-三磷酸;iPDP: 异戊烯基腺苷5-二磷酸;iPMP: 异戊烯基腺苷5-磷酸;iPA: 异戊烯基腺苷;iP: 异戊烯基腺嘌呤。

Note: 1. cytokinin oxidase; 2. cis-trans isomerase; 3. trans-zeatin-O-glucosyltransferase; 4. -glucosidase; 5. cis-zeatin-O-glucosyltransferase; DMAPP: dimethylallyl diphosphate; iPTP: isopentenyladenosine 5-triphosphate; iPDP: isopentenyladenosine 5-diphosphate; iPMP: isopentenyladenosine 5-monophosphate; iPA: isopentenyladenosine; iP: Isopentenyladenineip.

图2 植物细胞分裂素的生物合成及代谢^[19]

Fig.2 Proposed biosynthetic and metabolic pathway of cytokinins in plants^[19]

早期利用茎的体外形成确定了细胞分裂素信号途径中的重要因子,过量表达其中一个调节因子可以激活细胞分裂素反应,从而在不添加外源细胞分裂素时促进茎的再生^[36-37]。Kakimoto 利用35S增强子的T-DNA标签法筛选得到功能获得性突变体 *cki1* (cytokinin independent 1)。CKI1 是一种组氨酸激酶,过量表达时可以取代外源细胞分裂素的作用,满足愈伤组织生长的需要^[38]。Hwang 等在拟南芥原生质体中发现,瞬时表达 CKI1 可以激活细胞分裂素原初反应基因(Primary Response Gene)的启动子^[33]。

CKI1 由跨膜区、组氨酸蛋白激酶的激酶区以及信号接收区3个部分组成,其中激酶区以及信号接收区分别带有保守的组氨酸和天冬氨酸^[38]。在真菌和细菌中,组氨酸蛋白激酶 HK (Histidine Kinase) 介导的信号转导需要通过组氨酸到天冬氨酸的磷酸化将信号传递给下游应答元件。目前认为由组氨酸到天冬氨酸磷酸化介导的双元组分系统同样适用于植物细胞分裂素信号转导途径^[39]。结构上保守的组氨酸和天冬氨酸对各种信号途径中磷酸化过程是必要的^[39-40],

推测 CKI1 可能是细胞分裂素的一个受体。但是,尚不能证实 CKI1 能够与细胞分裂素能够直接结合^[43]。有研究表明,功能缺失突变体 *cki1* 多为致死突变,表现出异常的雌配子体发育,CKI1 可能与雌配子体发育有关^[41]。

与上述方法相反,Inoue 等采用“负筛选”的方法,通过以甲基乙磺酸(EMS)处理拟南芥,在1900个植株中得到外源细胞分裂素敏感株 *cre1*,在组织培养的过程中这个株系对细胞分裂素的敏感度下降^[43-44]。拟南芥 CRE1 编码一种组氨酸激酶,该酶具有2个C端反应调节区(Response Regulator Domain)、1个组氨酸激酶区(Hs Kinase Domain)和2个横跨膜区(Transmembrane Region),其一级结构与 CKI1 差异较大,同源性约30%,但两者具有相似的功能结构域及排列方式,跨膜区都不具备定位于质膜上所必须的21~23个连续的疏水残基^[33]。

酵母缺失突变体的遗传互补试验已经确定 CRE1 是细胞分裂素的受体。酵母中存在一种磷酸传递(Phosphorelay)途径^[44]。参与这一途径主要包括组氨酸激酶、组氨酸转移蛋

白和反应调节子3个组分。渗透平衡中的传感物(Sensor)组氨酸激酶SLN1,通过一系列的磷酸化作用能够抑制SSK2的活性。SSK2是一种促细胞分裂素激活蛋白激酶(MAPKKK)。在正常渗透压条件下,野生型酵母在ATP作用下使SLN1磷酸化,并继续将磷酸基传递给组氨酸转移蛋白YPD1,YPD1能够将磷酸基转移到反应调节子SSK1,磷酸化的SSK1不能激活下游SSK2,所以在酵母体内缺失SLN1时无法实现SSK1的磷酸化,从而使SSK2始终处于活性状态,导致酵母突变体的死亡。诱导磷酸酯酶PTP2在酵母体内表达可以达到抑制SSK2活性的目的,从而使得致死的酵母恢复生活力,因此缺失SLN1而带有PTP2的酵母在半乳糖(Gal)诱导的启动子控制下是有条件的致死,即只有在半乳糖存在时才可以生长,否则死亡。当培养基中没有半乳糖而添加细胞分裂素时,在YPD1存在的条件下,诱导酵母体内CRE1异源表达仍然可以使其存活。这证明CRE1与细胞细胞分裂素具有较高的亲和力,参与酵母的磷酸转移机制^[45](图3)。

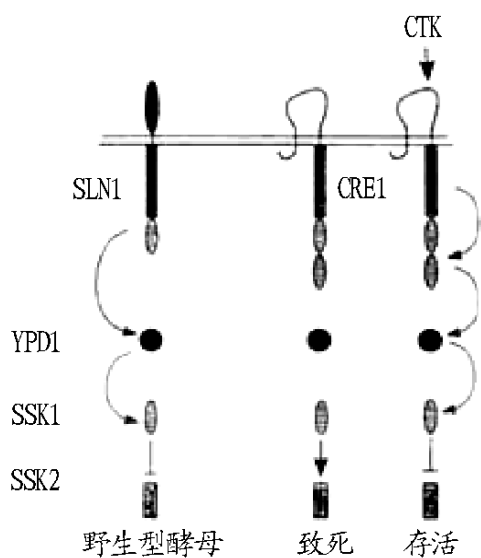


图3 CRE1通过内源的酵母磷酸转移机制发挥作用^[44]

Fig.3 CRE1 acts through the endogenous yeast phosphotransfer mechanism^[44]

已经在拟南芥中发现了类似酵母磷酸传递组分的存在,包括5个磷酸转运子AHP(Arabidopsis Hs Phosphotransfer Factor)以及22个反应调节子ARR(Arabidopsis Response Regulator)^[46-47],都具有保守的组氨酸残基、天冬氨酸残基。上游信号通过定位于AHPs和ARRs的保守位点之间磷酸基团有次序的转移而得到传递和扩大,导致基因表达的改变,最终引发生理反应^[33-43]。但有趣的是,AHPs中保守的组氨酸残基和ARRs中保守的天冬氨酸残基突变后,并不影响其相应的功能^[33]。这很难解释CKI1和CRE1对保守的组氨酸和天冬氨酸残基的依赖性,推测高等植物中某些双元组分系统可能与低等生物中的作用机制不同。AHP1~AHP5具有一定的同源性^[48-49]。Ueguchi等发现,AHK2和AHK3主要在野生型植株的地上部分表达,并且与CRE1的完整序列具高度的同源性^[52]。在叶肉原生质体暂时表达系统中,两者可以调节细胞分裂素原初反应基因的启动子^[50]。以拟南芥原生质体为材料,发现在外源添加反式-玉米素后,AHP-GFP融合蛋白能够迅速作出应答,从细胞质转移到细胞核^[33]。这些都可以有力地证明AHPs在磷酸传递组分中发挥着桥梁作用,可以将组氨酸激酶上的磷酸基团传递给下游应答基因ARRs。

除ARR16外,大多数ARR都是核定位蛋白,其核定位模

式并不是由保守的天冬氨酸基团决定的,并且表达均不依赖外源激素^[51]。根据表达模式和结构的差异,将ARRs分为A型和B型2种。A型ARRs包括10个基因,仅由保守的信号接受区域(Receiver Domain)构成,大多数A型ARRs的mRNA呈稳定状态,其表达明显受细胞分裂素的诱导^[34,46],能够迅速、特异性的提高表达水平,但不论是功能获得性突变体还是功能缺失突变体均无明显表型^[52]。另外,有研究发现一种A型ARR。ARR4参与的细胞分裂素信号途径可以受到光的调节,黑暗中无法检测到的ARR4,在光照条件下却可以积累;更特异的是,红光条件下ARR4得到积累,在远红外光条件下不合成甚至发生降解,过量表达ARR4的转基因植物对红光高度敏感^[53]。推测ARR4很可能作为一个信号分子介导了细胞分裂素和红光信号转导途径。B型ARRs除了接收区域外,还含有一个融于接收区域、类似c-Myc的输出区域(Output Domain)^[46,54],可能作为转录因子参加细胞分裂素信号途径^[46]。过量表达B型ARR,如ARR1,呈现出对细胞分裂素敏感性增加、促进茎叶生长、抑制根伸长的表型^[52,55]。此外,Hwang等发现,过量表达ARR2、ARR10,植物基部的细胞分裂素水平大大增加,组织培养过程中没有外源细胞分裂素也可以促进不定芽的生成^[33,42]。

利用瞬时和稳定表达系统研究发现,B型ARRs能够以不依赖细胞分裂素的方式激活A型ARRs的表达,同时A型ARRs受到自身的负反馈调节^[52,55]。目前,普遍接受的细胞分裂素信号途径是细胞分裂素同CRE或其他相关的组氨酸激酶,在ATP的作用下发生磷酸化,之后将磷酸基团发生由AHP到B型ARR的传递,并激活A型ARR基因的转录,与各种效应物相互作用,共同调节细胞分裂素特有的反应,最终影响植物的生长发育^[56](图4)。

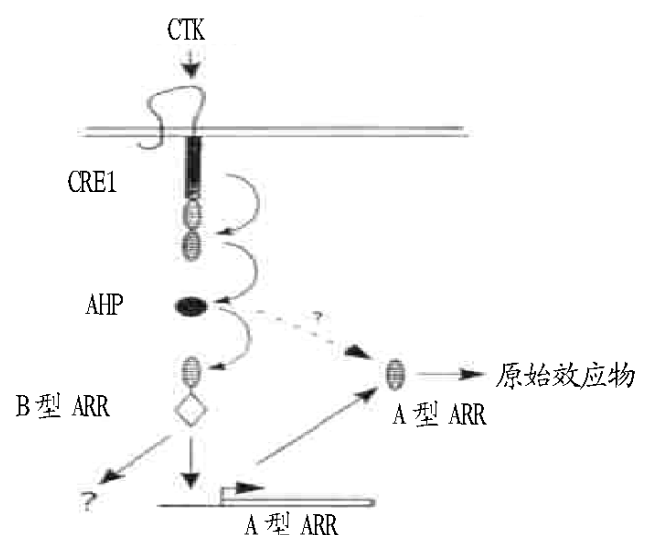


图4 CRE1和拟南芥细胞分裂素信号传递模型^[54]

Fig.4 The node of signal transduction of CRE1 and cytokinin in Arabidopsis thaliana^[54]

尽管对细胞分裂素信号途径中的CRE1、CKI1、AHP和ARR功能已经有所研究,但是仅仅简单地根据酵母中磷酸传递模式提出的拟南芥细胞分裂素信号转导途径,显然不能完美地诠释细胞分裂素与其他激素、信号分子间复杂的偶联与互动,需要在系统的遗传学、生物化学以及细胞生物学研究基础上开展更深入的研究。

参考文献

- [1] MILLER C O, SKOOG F, OKUMURA F S, et al. Isolation, structure and synthesis of kintin, a substance promoting cell division[J]. J Am Chem Soc, 1956, 78:1375-1380.

- [2] RICHARD A. The 50th Anniversary of a New Plant Hormone[J]. *Plant Physiol*, 2005, 138(3):1177 - 1184.
- [3] WERNER T, MOHYA V, SIRNAD M, et al. Regulation of plant growth by cytokinin[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98:10487 - 10492.
- [4] LETHAM D S. A factor inducing cell division from Zea mays[J]. *Life Sci*, 1963, 8:569 - 573.
- [5] STOLT C, NORSTROM A. An alternative cytokinin biosynthesis pathway[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97:14778 - 14783.
- [6] SENZ L, JONES L H, ORCPEZA C. Endogenous isoprenoid and aromatic cytokinins in different plant parts of *Cocos nucifera* (L.) [J]. *Plant Growth Regulation*, 2003, 39:205 - 215.
- [7] 曹仪植. 植物生理学[M]. 兰州: 兰州大学出版社, 1998:264 - 265.
- [8] MOK D W, MOK M C. Cytokinin metabolism and action[J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 2001, 52:89 - 118.
- [9] AYA Y, TANAKA Y, NISHIMURA S. 5-AMIB a direct precursor of cytokinin in *Dicotyledium discoidum*[J]. *Nature*, 1978, 271:545 - 547.
- [10] CHENG M, MELTZ D K. Cytokinin biosynthesis in a cell-free system from cytokinin autotrophic tobacco tissue cultures[J]. *FEBS Lett*, 1979, 107:15 - 20.
- [11] AKYOSH D E, KLEE H, AMASINO R M, et al. The DNA of *Agrobacterium tumefaciens* encodes an enzyme of cytokinin biosynthesis[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, 81:5994 - 5998.
- [12] HORGAN R. A new cytokinin metabolite[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1975, 65:358 - 363.
- [13] GOLOVKO A. Identification of a tRNA isopentenyl-transferase gene from *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant Molecular Biology*, 2002, 49:161 - 169.
- [14] TAKEI K, SAKAKIBARA H, SUKIYAMA T, et al. Identification of genes encoding adenylate isopentenyl-transferase, a cytokinin biosynthesis enzyme, in *Arabidopsis thaliana*[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(28):26405 - 26410.
- [15] KAKIMOTO T. Biosynthesis and perception of cytokinins[C]//17th international conference on plant growth substance. Czech Republic, 2001.
- [16] SUNJ Q, NUQ W, PEIR TARKOWSKI, et al. The *Arabidopsis* AIP18/PG22 gene encodes an isopentenyl-transferase that is involved in the novel cytokinin biosynthesis[J]. *Plant Physiology*, 2003, 131:167 - 176.
- [17] SAKAKIBARA H, TAKEI K. Identification of cytokinin biosynthesis genes in *Arabidopsis*: A breakthrough for understanding the metabolic pathway and the regulation in higher plants[J]. *J Plant Growth Regul*, 2002, 21:17 - 23.
- [18] SU W, HOWELL S H. A single genetic locus, *ckr1*, defines *Arabidopsis* confer cytokinin insensitivity and ethylene overproduction, respectively[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95:4766 - 4771.
- [19] MOK D W, MOK M C. Cytokinin metabolism and action[J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 2001, 52:89 - 118.
- [20] KAKIMOTO T. Biosynthesis of cytokinins[J]. *Journal of Plant Research*, 2003, 116:233 - 239.
- [21] BARRY G F, ROGERS S G, FRALEY R T, et al. Identification of a cloned cytokinin biosynthetic gene[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, 81:4776 - 4780.
- [22] TALLER B J. Distribution, biosynthesis, and function of cytokinins in tRNA [A]//MOK D W S, MOK M C. Cytokinins chemistry, activity, and function. Boca Raton: CRC Press, 1994:101 - 112.
- [23] KAKIMOTO T. Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate: AIP/ADP isopentenyltransferases[J]. *Plant Cell Physiol*, 2001, 42:677 - 685.
- [24] DASKALOVA S, MCCORMAC A, SCOTT N, et al. Effect of seed-specific expression of the *ipt* gene on *Nicotiana tabacum* L. seed composition[J]. *Plant Growth Regulation*, 2007, 51:6167 - 6903.
- [25] REDIG P, SCHMILLING T, VAN ONCKELEN H, et al. Analysis of cytokinin metabolism in *ipt* transgenic tobacco by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Plant Physiol*, 1996, 112:141 - 148.
- [26] EKL F S, STOLT C, MORTIZ T, et al. Cytokinin metabolites and gradients in wild type and transgenic tobacco with moderate cytokinin overproduction[J]. *Physiol Plantarum*, 1996, 98:333 - 344.
- [27] ZHANG R, ZHANG X, WANG J, et al. The effect of auxin on cytokinin levels and metabolism in transgenic tobacco tissue expressing an *ipt* gene[J]. *Plant*, 1995, 19684 - 19694.
- [28] HORGAN R. Cytokinins[M]//WILKINS M B. Advanced plant physiology. London: Longmans, 1984:89 - 101.
- [29] ZUBKO E, ADAMS C J, MACH CKOV I, et al. Activation tagging identifies a gene from *Petunia hybrida* responsible for the production of active cytokinins in plants[J]. *Plant J*, 2002, 29:797 - 808.
- [30] CATEROU M, DUBOIS F, SMEIS R, et al. An *Arabidopsis* mutant overproducing cytokinins and expressing in vitro organogenic capacity[J]. *Plant Cell*, 2002, 10:1009 - 1019.
- [31] TAKEI K, TAKAHASHI T, SUKIYAMA T, et al. Multiple routes communicating nitrogen availability from roots to shoots: a signal transduction pathway mediated by cytokinin[J]. *J Exp Bot*, 2002, 53:971 - 977.
- [32] SWARUP R, PARRY G, GRAHAMIN, et al. Auxin cross-talk: integration of signaling pathways to control plant development[J]. *Plant Mol Biol*, 2002, 49:411 - 426.
- [33] HWANG I, SHEEN J. Two-component circuitry in *Arabidopsis* cytokinin signal transduction[J]. *Nature*, 2001, 413:383 - 389.
- [34] BRANDSTATTER I, KIEBER J J. Two genes with similarity to bacterial response regulators are rapidly and specifically induced by cytokinin in *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell*, 1998, 10:1009 - 1019.
- [35] IMAMURA A, HANAKI N, UEDA H, et al. Response regulators implicated in His-to-Asp phosphotransfer signaling in *Arabidopsis*[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1998, 95:2691 - 2696.
- [36] SUKIYAMA M. Organogenesis in vitro[J]. *Curr Opin Plant Biol*, 1999, 2:61 - 64.
- [37] SHEEN J. Phosphorelay and transcription control in cytokinin signal transduction[J]. *Science*, 2002, 296:1650 - 1652.
- [38] KAKIMOTO T. CK1, a histidine kinase homolog implicated in cytokinin signal transduction[J]. *Science*, 1996, 274:982 - 985.
- [39] STOCK A M, ROBINSON V L, GOUDREAU P N. Two-component signal transduction[J]. *Annu Rev Biochem*, 2000, 69:183 - 215.
- [40] THOMAS C P, KAY R. Eukaryotic signal transduction via histidine-aspartate phosphorelay[J]. *J Cell Sci*, 2000, 113:3141 - 3150.
- [41] HSCHKE M S, JONES G L, OISUGA D, et al. An *Arabidopsis* histidine kinase is essential for megagametogenesis[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99:15800 - 15805.
- [42] INOUE T, HIGUCHI M, HASHIMOTO Y, et al. Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*[J]. *Nature*, 2001, 409:1060 - 1063.
- [43] SUZUKI T, SAKURAI K, IMAMURA A, et al. Compilation and characterization of histidine-containing phosphotransmitters implicated in His-to-Asp phosphorelay in plants: AHK signal transducers of *Arabidopsis thaliana*[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 64:2486 - 2489.
- [44] POSAS F, TAKEKAWA M, SAITO H. Signal transduction by MAP kinase cascades in budding yeast[J]. *Curr Opin Microbiol*, 1998, 1:175 - 182.
- [45] YAMADA H, SUZUKI T, TERADA K, et al. The *Arabidopsis* AHK4 histidine kinase is a cytokinin binding receptor that transduces cytokinin signals across the membrane[J]. *Plant Cell Physiol*, 2001, 42:1017 - 1023.
- [46] D'AGOSTINO I B, KIEBER J J. Phosphorelay signal transduction: the emerging family of plant response regulators[J]. *Trends Biochem Sci*, 1999, 24:452 - 456.
- [47] SCHALLER G E. Histidine kinases and the role of two-component systems in plants[J]. *Adv Bot Res*, 1999, 32:109 - 148.
- [48] URAO T, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. Two-component systems in plant signal transduction[J]. *Trends Plant Sci*, 2000, 5:67 - 74.
- [49] The *Arabidopsis* Genome Initiative. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*[J]. *Nature*, 2000, 408:796 - 815.
- [50] UEGUCHI C, KOZUMI H, SUZUKI T, et al. Novel family of sensor histidine kinase genes in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant Cell Physiol*, 2001, 42:231 - 235.
- [51] KIBA T, YAMADA H, MIZUNO T. Characterization of the ARR15 and ARR16 response regulators with special reference to the cytokinin signaling pathway mediated by the AHK4 histidine kinase in roots of *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant Cell Physiol*, 2002, 43:1059 - 1066.
- [52] SAKAI H, HONMA T, AOYAMA T, et al. ARR1, a transcription factor for genes immediately responsive to cytokinins[J]. *Science*, 2001, 294:1519 - 1521.
- [53] SWEEER U, EICHENBERG K, LOHRMANN J, et al. Interaction of the response regulator *arr4* with phytochrome B in modulating red light signaling[J]. *Science*, 2001, 294:1108 - 1111.
- [54] IMAMURA A, HANAKI N, NAKAMURA A, et al. Compilation and characterization of *Arabidopsis thaliana* response regulators implicated in His-Asp phosphorelay signal transduction[J]. *Plant Cell Physiol*, 1999, 40:733 - 742.
- [55] SAKAI H, AOYAMA T, OKA A. *Arabidopsis* ARR1 and ARR2 response regulators operate as transcriptional activators[J]. *Plant J*, 2000, 24:703 - 711.
- [56] HABERER G, KIEBER J J. Cytokinins: New insights into a classic phytohormone[J]. *Plant Physiol*, 2002, 128:354 - 362.