



细胞分裂素调控种子发育、休眠与萌发的研究进展

宋松泉^{1,2*}, 刘军^{2*}, 杨华³, 张文虎², 张琪², 高家东²

¹中国科学院植物研究所, 北京 100093; ²广东省农作物种质资源保存与利用重点实验室/广东省农业科学院农业生物基因研究中心, 广州 510640; ³湖南农业大学生物科学与生物技术学院, 长沙 410128

摘要 种子萌发是子代植株建立、生长和繁育的重要阶段, 在种子植物生命周期中起重要作用。种子休眠是在发育过程中形成的, 在生理成熟期达到峰值。种子休眠与萌发的植物激素调控可能是种子植物中一种高度保守的机制。细胞分裂素(CK)是植物体内的一种重要信号分子, 调控植物生长发育的许多方面。生物活性CK的水平由其生物合成、活化、失活、再活化和降解之间的平衡所调控, 种子的发育、休眠与萌发受生物活性CK的水平和信号转导途径调控。该文综述了CK的生物合成与代谢、信号转导以及对种子发育、休眠与萌发的调控作用, 提出了在本领域需要进一步研究的科学问题, 旨在为理解CK调控种子发育、休眠与萌发的分子机理提供参考。

关键词 细胞分裂素, 代谢, 分子机制, 种子休眠与萌发, 信号转导

宋松泉, 刘军, 杨华, 张文虎, 张琪, 高家东 (2021). 细胞分裂素调控种子发育、休眠与萌发的研究进展. 植物学报 56, 218–231.

种子在植物生命周期中起着极其重要的作用, 把遗传信息从亲代传递给子代, 是植物(特别是一年生和二年生植物)生命的终点和起点。种子萌发是子代植株建立、生长和繁育中的重要事件; 而种子休眠是植物在长期进化过程中形成的一种适应性机制, 为了确保物种的生存与繁衍, 种子选择在最适生长与发育季节的初始时期完成休眠解除与萌发(Baskin and Baskin, 2014; 邓志军等, 2019)。在水稻(*Oryza sativa*)、小麦(*Triticum aestivum*)和玉米(*Zea mays*)等禾谷类作物中, 种子收获前休眠是一种理想的农艺性状, 原因是在长期的驯化与栽培过程中, 种子的休眠特性被选择性丧失。例如, 当成熟后期遇到持续阴雨时, 种子容易在收获前萌发(preharvesting sprouting), 从而显著降低种子(粮食)的产量和质量。另一方面, 具有深休眠的种子其萌发速率和萌发率均显著下降, 最终导致缺苗和生长不一致, 也将严重影响作物的产量(Bewley et al., 2013; 徐恒恒等, 2014)。

研究表明, 种子的休眠释放与萌发是由遗传和环境因素共同决定的, 其中植物激素调控可能是种子植物中一种高度保守的机制(Nonogaki, 2014, 2017)。

脱落酸(abscisic acid, ABA)诱导和维持种子休眠, 抑制种子萌发; 赤霉素(gibberellin, GA)则促进种子萌发和拮抗ABA对种子萌发的抑制作用(Nonogaki, 2019; Zubo and Schaller, 2020)。除了ABA和GA外, 细胞分裂素(cytokinin, CK)、乙烯(ethylene)和生长素(auxin)也在种子的休眠释放和萌发中起重要作用(Shu et al., 2016)。

细胞分裂素是一种重要的植物激素, 在调控植物生长发育的许多过程中起关键作用, 包括细胞的分裂与分化、茎和根的生长、顶端优势维持、衰老、果实和种子发育、营养信号传递以及对生物和非生物胁迫的响应(Hwang et al., 2012; Jameson and Song, 2016; Wybouw and De Rybel, 2019)。近年来, CK的生物合成与代谢, 尤其是CK信号转导途径的研究取得了重要进展(Lomin et al., 2018; Arkhipov et al., 2019; Hallmark and Rashotte, 2019; Chen et al., 2020)。本文在综述CK的生物合成与代谢及其信号转导的基础上, 重点介绍CK调控种子发育、休眠与萌发的研究进展, 并提出了在本领域需要进一步研究的科学问题, 旨在为阐明CK调控种子发育、休眠与萌发的

收稿日期: 2020-08-03; 接受日期: 2021-01-05

基金项目: 广东省农作物种质资源保存与利用重点实验室项目(No.2020B121201008)和国家自然科学基金(No.31871716)

* 通讯作者。E-mail: sqsong@ibcas.ac.cn; liujun@gdaas.cn

分子机理提供参考。

1 细胞分裂素的生物合成、降解与失活

植物中天然存在的CK是腺嘌呤的衍生物,在 N^6 端含有1个由异戊二烯(isoprene)衍生的侧链或者1个芳香族侧链,分别称为类异戊二烯CK(isoprenoid CK)和芳香族CK(aromatic CK)(Sakakibara, 2006)。类异戊二烯CK包括 N^6 -异戊烯腺嘌呤(N^6 -isopentenyladenine, iP)、反式玉米素(*trans*-zeatin, tZ)、顺式玉米素(*cis*-zeatin, cZ)和二氢玉米素(dihydrozeatin, DZ)。其中,主要衍生物通常是tZ和iP及其糖的结合物,但在不同的植物物种、组织和发育阶段存在较大的差异(Sakakibara, 2006)。例如, tZ和iP型CK是拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中的主要形式,而cZ型CK则存在于玉米、水稻和鹰嘴豆(*Cicer arietinum*)中。而芳香族CK,如*ortho*-topolin、*meta*-topolin及其甲氧基衍生物(分别为*ortho*-methoxytopolin和*meta*-methoxytopolin)和6-苄基腺嘌呤(6-benzyladenine, 6-BA)仅存在于某些植物中。尽管一些人工合成的CK衍生物具有生物活性,但还未在植物中发现。CK的活性形式是游离态(free base) CK(Hothorn et al., 2011; Lomin et al., 2015),但CK也可能以非活性形式存在,如核苷(其中1个核糖与嘌呤环的 N^9 连接)和核苷酸(其中核糖部分包含1个磷酸基)(Kieber and Schaller, 2018)。

细胞分裂素曾被认为只能在根尖和茎尖合成,但实际上它们能在植物体内的不同部位合成和起作用(Sakakibara, 2006)。CK通过木质部(主要以tZ-核苷的形式)从根运输到茎,也能够通过韧皮部(主要以iP型CK的形式)从茎运输到根(Kieber and Schaller, 2018)。植物细胞中生物活性CK的水平由其生物合成、活化、失活、降解和运输调节,从而决定细胞中CK的信号强度(Sakakibara, 2006; Jameson and Song, 2016)。植物细胞中CK及其代谢物的多样性表明,它们之间的相互转化可能是CK作用的主要调控机制(Hošek et al., 2020)。

1.1 细胞分裂素的生物合成

1.1.1 细胞分裂素生物合成的主要反应

细胞分裂素生物合成的最初步骤和限速步骤是异戊

烯基转移酶(isopentenyltransferase, IPT)分别将AMP、ADP或者ATP和二甲基丙烯基二磷酸(dimethylallyl diphosphate, DMAPP)转化为iP-核苷酸(iP-nucleotide)(Sakakibara, 2006; Frébort et al., 2011)。iP-核苷酸再被细胞色素P450单加氧酶(cytochrome P450 monooxygenase, CYP735A)转化为tZ-核苷酸(Hirose et al., 2008)。CK核苷5'-单磷酸磷酸核糖水解酶(cytokinin nucleoside 5'-monophosphate phosphoribohydrolase或LOG(lonely guy))直接激活tZ-核苷酸和iP-核苷酸成为游离态CK,包括玉米素(zeatin, Z)和iP(图1)(Kurakawa et al., 2007; Frébort et al., 2011)。

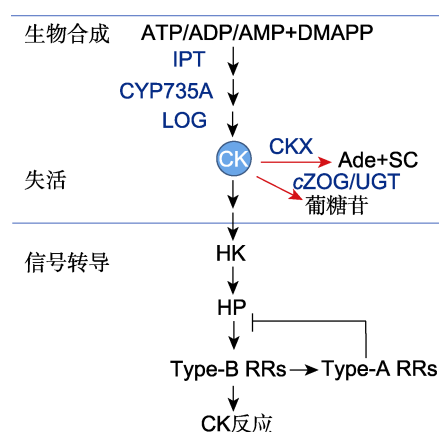


图1 细胞分裂素(CK)代谢和信号转导模型(改编自Kieber and Schaller, 2018; Zubo and Schaller, 2020)

Ade: 腺嘌呤; ADP: 腺苷二磷酸; AMP: 腺苷一磷酸; ATP: 腺苷三磷酸; CKX: CK氧化酶/脱氢酶; CYP735A: 细胞色素P450单加氧酶; cZOG: 顺式玉米素-O-葡萄糖基转移酶; DMAPP: 二甲基丙烯基二磷酸; HK: 组氨酸激酶; HP: 组氨酸磷酸转移蛋白; IPT: 异戊烯基转移酶; LOG: CK核苷5'-单磷酸磷酸核糖水解酶; SC: 侧链; Type-B RRs: 类型-B反应调控因子; Type-A RRs: 类型-A反应调控因子; UGT: UDP糖基转移酶

Figure 1 A model of cytokinin (CK) metabolism and signaling transduction (modified from Kieber and Schaller, 2018; Zubo and Schaller, 2020)

Ade: Adenine; ADP: Adenosine diphosphate; AMP: Adenosine monophosphate; ATP: Adenosine triphosphate; CKX: CK oxidase/dehydrogenase; CYP735A: Cytochrome P450 monooxygenase; cZOG: *cis*-Zeatin-O-glucosyltransferase; DMAPP: Dimethylallyl diphosphate; HK: Histidin (His) kinase; HP: His phosphotransfer protein; IPT: Isopentenyltransferase; LOG: CK nucleoside 5'-monophosphate phosphoribohydrolase; SC: Sidechain; Type-B RRs: Type-B response regulators; Type-A RRs: Type-A response regulators; UGT: UDP glycosyltransferase

此外,在发现CK后不久,tRNA被假定为CK的主要来源,原因是在tRNA的水解产物中发现了类异戊二烯CK。一些tRNA种类含有以尿苷开头的与密码子互补的反密码子,如tRNA^{Leu}和tRNA^{Ser},它们在反密码子邻近携带1个异戊二烯腺苷。因此,tRNA的异戊二烯化(tRNA prenylation)至少在某种程度上有助于CK的产生。产生CK途径的第一步由tRNA异戊烯基转移酶(tRNA-isopentenyltransferase, tRNA-IPT)催化(Sakakibara, 2006)。由于tRNA的异戊二烯组分含有1个顺式羟基,因此tRNA的降解是cZ型CK的一种来源;但顺式羟基化酶(cis-hydroxylating enzyme)的生化性质尚未被鉴定(Sakakibara, 2006)。对tRNA转换速率的研究表明,tRNA的降解不是CK合成的主要途径;但一些物种(如玉米和水稻)含有大量的cZ型CK,因而tRNA衍生的CK不应被忽视(Sakakibara, 2006)。

1.1.2 类异戊二烯细胞分裂素的生物合成

目前已在拟南芥(Takei et al., 2001)、矮牵牛(*Petunia hybrida*) (Zubko et al., 2002)和啤酒花(*Humulus lupulus*) (Sakano et al., 2004)中鉴定了IPT基因。在拟南芥中,7个IPT基因(*AtIPT1*和*AtIPT3-8*)参与CK的生物合成(Takei et al., 2001)。生化研究表明,植物IPT优先利用ADP或ATP而不是AMP作为异戊二烯基的受体,产生iP-核苷5'-二磷酸(iP riboside 5'-diphosphate, iPRDP)或iP-核苷5'-三磷酸(iP riboside 5'-triphosphate, iPRTP) (Sakano et al., 2004; Hošek et al., 2020)。AtIPT1对AMP、ADP和ATP的 K_m 值分别为18、14.6和11.4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,对DMAPP的 K_m 值为8.3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (Takei et al., 2001)。AtIPT4对ADP、ATP和DMAPP的 K_m 值分别为9.1、3.4和11.6 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (Kakimoto, 2001)。在过表达任一*AtIPT*的拟南芥转基因株系中,iP型CK显著积累,表明所有的AtIPT对于类异戊二烯供体都具有相似的底物偏好(Sakakibara et al., 2005)。

DMAPP通过甲基赤藓糖醇磷酸(methylerythritol phosphate, MEP)途径和甲羟戊酸(mevalonate, MVA)途径合成,普遍存在于真核生物的细胞质中(Sakakibara, 2006)。当DMAPP作为CK生物合成的底物时,其主要产物是iP-核苷酸。羟甲基丁烯基二磷酸(hydroxymethylbutenyl diphosphate, HMBDP)是一种

MEP途径的代谢中间产物,当IPT作用于HMBDP时,能够直接形成tZ-核苷酸(Sakakibara, 2006)。在烟草(*Nicotiana tabacum*) BY-2细胞中,洛伐他汀(lovastatin, MVA途径的抑制剂)可显著减少CK的积累,表明MVA途径是类异戊二烯CK侧链的代谢来源。在拟南芥中,AtIPT1、AtIPT3、AtIPT5和AtIPT8定位于质体(Kasahara et al., 2004);正常条件下,AtIPT3和AtIPT5是幼苗和成熟植株中的主要异构体(Miyawaki et al., 2004)。因此,质体似乎是高等植物中iP型CK生物合成的主要细胞器。利用对MEP或者MVA途径特异性¹³C标记的前体进行选择实验表明,iP和tZ型CK的类异戊二烯侧链主要来源于MEP途径(Kasahara et al., 2004),这与IPT的亚细胞定位结果一致。

1.1.3 芳香族细胞分裂素的生物合成

芳香族CK(如6-BA和topolin)已经在一些植物中被鉴定,包括杨树(*Populus*) (Strnad, 1997)和拟南芥(Tarkowska et al., 2003),但它们是否普遍存在于植物中还不清楚。尽管它们表现出较强的CK活性,但其生物合成和降解的途径尚不明确。芳香族CK与类异戊二烯CK所涉及的酶和受体都能识别这2种类型的CK成员,因此二者的糖基化及其与细胞信号转导系统相互作用的机制可能相同(Mok et al., 2005)。在番茄(*Solanum lycopersicum*)果皮组织中,6-BA的修饰被一种P450酶的有效抑制剂美替拉酮(metyrapone)强烈抑制(Sakakibara, 2006)。虽然具体作用方式尚不清楚,但CYP735A或者其它的P450可能参与topolin的生物合成(Sakakibara, 2006)。

1.2 细胞分裂素的降解与失活

1.2.1 生物活性细胞分裂素的降解

细胞分裂素氧化酶/脱氢酶(cytokinin oxidase/dehydrogenase, CKX)在N⁶侧链上不可逆地裂解游离态CK和CK核苷,以降低生物活性CK的水平(图1) (Sakakibara, 2006; Tuan et al., 2019; Chen et al., 2020)。研究发现,CKX的过表达导致内源CK水平降低和多种发育缺陷;tZ和iP都能被CKX裂解,但DZ和人工合成的CK(如激动素(kinetin)和6-BA)对CKX的裂解具有抗性(Zalabák et al., 2014)。

1.2.2 细胞分裂素的糖基化与去糖基化

顺式玉米素-O-葡糖基转移酶(*cis*-zeatin-O-glucosyltransferase, *cZOG*)催化*tZ*、*cZ*和*DZ*的侧链羟基葡糖基化为O-葡糖苷(O-glucoside)(图1)或O-木糖苷(O-xyloside); O-葡糖基化是可逆的, 能被 β -葡糖苷酶(β -glucosidase, β Glc)去糖基化(deglycosylation), 重新生成生物活性CK (Sakakibara, 2006)。UDP糖基转移酶(UDP glycosyltransferase, UGT)催化CK在嘌呤部分的*N3*、*N7*和*N9*位置上的葡糖基化成为*N*-葡糖苷(*N*-glucoside), β Glc不能有效地裂解*N*-葡糖基结合物(*N*-glucoconjugate), 因此, 实际上*N*-葡糖基化是不可逆的(Sakakibara, 2006)。

细胞分裂素的葡糖基结合物在生物测定中无生物活性, 这些被结合的CK不能与CK受体结合(Spichal et al., 2004)。尽管O-葡糖苷和*N*-葡糖苷稳定性差异的生理意义至今还不清楚, 但易裂解的O-葡糖苷被认为是CK失活的稳定贮藏形式。虽然与CK O-葡糖基化有关的基因已被鉴定(Mok et al., 2005), 但尚缺乏关于*N*-葡糖基化的分子生物学信息。在拟南芥中, UGT76C1和UGT76C2在*N7*或*N9*位置葡糖基化一系列CK碱基, 也在*N7*位置葡糖基化*tZ*, 生成*tZ*-O-葡糖苷(*tZ*-O-glucoside)(Hou et al., 2004)。

2 细胞分裂素信号转导

细胞分裂素信号转导途径也被称为双组分信号转导系统(two-component signaling system), 主要包括组氨酸激酶(histidine (His) kinase, HK)、组氨酸磷酸转移蛋白(His phosphotransfer protein, HP)和反应调控因子(response regulator, RR)。其中HK作为CK的受体, HP将信号从HK传递到细胞核的RR, 从而调控靶基因转录(图1, 图2)(Hwang et al., 2012; Kieber and Schaller, 2018; Lomin et al., 2018; Arkhipov et al., 2019; Hallmark and Rashotte, 2019; Zubo and Schaller, 2020)。双分子荧光互补(bimolecular fluorescence complementation, BiFC)实验证明, 拟南芥CK受体AHK (*Arabidopsis* HK) 2-4均能与AHP (*Arabidopsis* HP)1-3相互作用, 且无明显的偏好; CK受体能形成同源和异源二聚体(Arkhipov et al., 2019)。AHK-AHK和AHK-AHP的相互作用主要定位

于内质网(endoplasmic reticulum, ER); 相反, 各种磷酸转移蛋白(AHP)的同源和异源二聚体主要存在于植物的细胞核中(Arkhipov et al., 2019)。

2.1 组氨酸激酶

组氨酸激酶包含1个保守的与CK结合的胞外CHASE (cyclases/His kinases-associated sensing extra-cellular)区域、至少2个跨膜(transmembrane, TM)结构域和1个细胞质区域(图2)(Hwang et al., 2012; Lomin et al., 2018; Arkhipov et al., 2019)。HK主要定位于ER膜(Wulfetange et al., 2011)。CHASE区域即感受器模块(sensor module, SM), 面向ER腔或者质外体(apoplast), 包括二聚界面(dimerization interface, DI)、PAS (Per-Arnt-Sim)结构域和类PAS结构域(Hothorn et al., 2011; Steklov et al., 2013; Romanov et al., 2018)。TM区域由2-5个 α -螺旋延伸组成。在马铃薯(*S. tuberosum*) CK受体的N端, StHK2、StHK3和StHK4的上游TM螺旋的数量分别为3、2和1个(Steklov et al., 2013)。HK的细胞质部分包括催化模块(catalytic module)和接收器模块(receiver module)。催化模块由HK-二聚体(HisKA或者DHPD)和H-ATPase (CAD)结构域组成(Pekárová et al., 2016); 接收器模块含有类接收器结构域(receiver-like domain, REC-like)和接收器结构域(receiver domain, REC), 它们定位于HK蛋白的C-端(图2)(Lomin et al., 2018; Pekarova et al., 2018; Arkhipov et al., 2019)。值得注意的是, AHK4同时具有组氨酸激酶和磷酸酶活性; 在配体缺乏时, AHK4的磷酸酶活性显著高于激酶活性, 能水解其接收器结构域上的磷酸基, 从而消耗可传递的磷酸基团(Mähönen et al., 2006)。

水稻、拟南芥和马铃薯CK受体序列的比对分析表明, 马铃薯同源基因中存在已知CK受体中所有的典型基序(Lomin et al., 2018)。在马铃薯催化模块中已鉴定了H、N、G1、F和G2基序, 在接收器模块中鉴定了DD-D-K基序。保守序列含有可磷酸化的His和天冬氨酸(Asp)残基。StHK2在其类接收器结构域中含有1个保守的Asp, 类似于拟南芥AHK2、番茄SIHK2及水稻OsHK3和OsHK5的同源基因。然而, 类接收器结构域中的全部类DD-D-K基序与接收器结构域中的相应序列几乎无相同点(Lomin et al., 2018)。

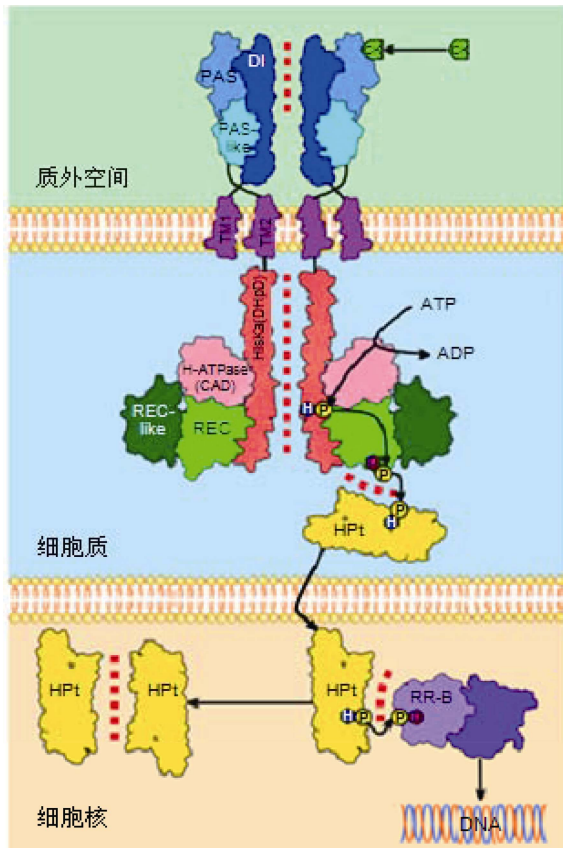


图2 细胞分裂素信号转导途径中的分子间相互作用(改自 Lomin et al., 2018; Arkhipov et al., 2019)

细胞分裂素信号被膜定位的组氨酸(His)激酶受体感受,通过His磷酸转移蛋白被传递到细胞核,从而激活细胞核中的转录因子家族。CK: 细胞分裂素; ATP: 腺苷三磷酸; ADP: 腺苷二磷酸; P: 磷酸; D: 保守的天冬氨酸; H: 保守的His; DI: 感受器模块的二聚体界面结构域; PAS和PAS-like: 感受器模块的CHASE结构域的子结构域; TM1和TM2: 跨膜结构域1和2; HisKA (DHpD): His激酶A结构域(二聚合作用和His磷酸转移结构域); H-ATPase (CAD): 腺苷三磷酸酶结构域(催化与ATP结合结构域); REC-like: 类接收器结构域; REC: 接收器结构域; HPT: 含有His的磷酸转移蛋白(磷酸传递蛋白); RR-B: B型反应调控因子(转录因子)。蛋白-蛋白相互作用(PPI)用红色虚线表示。

Figure 2 Intermolecular interactions in the cytokinin signaling pathway (modified from Lomin et al., 2018; Arkhipov et al., 2019)

Cytokinin signaling is perceived by membrane-localized Histidine (His) kinase receptors and is transduced to nucleus through a His phosphotransfer protein to activate a family of transcription factors in the nucleus. CK: Cytokinin; ATP: Adenosine triphosphate; ADP: Adenosine diphosphate; P: Phosphate; D: Conserved Aspartate; H: Conserved His; DI: Dimerization interface domain of the sensor module; PAS

and PAS-like: Subdomains of the CHASE domain of the sensor module; TM1 and TM2: Transmembrane domain 1 and 2; HisKA (DHpD): His kinase A domain (dimerization and His phosphotransfer domain); H-ATPase (CAD): Adenosine triphosphatase domain (catalytic and ATP-binding domain); REC-like: Receiver-like domain; REC: Receiver domain; HPT: His-containing phosphotransfer protein (phosphotransmitter); RR-B: Type B response regulator (transcription factor). Protein-protein interactions (PPI) are indicated by a red dotted line.

2.2 组氨酸磷酸转移蛋白

在CK信号转导途径中,HP(也称为His磷酸传递蛋白(His phosphotransmitter, HPT))在HK受体的下游起作用,介导磷酸基在多步骤磷酸转移中从活化的HK受体接收器结构域转移到RR接收器结构域(图1,图2)(Hwang et al., 2012; Arkhipov et al., 2019)。AHP不具有催化活性,实际上是作为RR自身磷酸化活性的高能磷酸供体。AHP是CK信号转导冗余的正调控因子(Hutchison et al., 2006),但它们也在植物其它HK下游(如CKI1 (CYTOKININ-INDEPENDENT1))起作用(Liu et al., 2017)。AHP蛋白具有1个保守的半胱氨酸残基,该残基能在体外和体内被一氧化氮(NO)S-亚硝酸化,抑制AHP作为磷酸转移蛋白的作用,降低AHP从HK接收磷酸基并将其转移到RR的能力(Feng et al., 2013)。

磷酸传递的信号转导、蛋白互作和高阶(higher-order)功能缺失突变的分析表明,AHP在功能上冗余且可以不加选择地与受体相互作用,磷酸基的转移是双向的(Deng et al., 2010)。在6个AHP(AHP1-6)中,AHP6缺乏保守的His残基,因此不能接受磷酸基,被称为伪AHP(pseudo-AHP)。AHP6负调控信号转导途径活性,很可能与AHP1-5竞争与活化受体的相互作用(Lomin et al., 2018)。

2.3 反应调控因子

反应调控因子是一个转录因子家族,包含1个保守的接受磷酸基的Asp残基(Keshishian and Rashotte, 2015)。根据其系统发生和结构域,RR家族成员可分为3种类型:A型、B型和C型(Schaller et al., 2007),但只有A型和B型RR与CK信号转导有关(Kieber and Schaller, 2018; Tuan et al., 2019; Zubo and Schaller, 2020)。B型RR包括ARR (*Arabidopsis* RR) 1、

ARR2、ARR10–14和ARR18–21, 能被HP接收器结构域中的Asp残基磷酸化激活, 作为CK反应的正调控因子起作用(Hwang et al., 2012)。B型RR的特征是包含1个接收器结构域和1个含有类MYB DNA结合结构域的长C-端延伸。接收器结构域包含1个保守的Asp残基, 当多步骤磷酸传递被激活时, Asp可作为调控磷酸化的位点。类MYB DNA结合结构域与1个短的(A/G) GAT核心DNA序列结合, 该序列对B型RR的结合作用非常关键(Zubo et al., 2017; Zubo and Schaller, 2020)。ChIP-seq (chromatin immunoprecipitation combined with sequencing)实验显示, B型RR在植物体内以CK依赖的方式与其靶点结合, 这种结合以类似于细菌RR的方式被接收器结构域磷酸化激活(Zubo et al., 2017)。

A型ARR (如ARR3–9、ARR15–17)由1个接收器结构域和1个短的C-端延伸组成, 作为CK信号转导的负反馈调控因子起作用; 但与B型RR不同, 它们缺乏典型的转录调控输出结构域(output domain) (Kieber and Schaller, 2018)。在对CK的反应中, A型RR通过B型RR的直接激活被诱导转录(Taniguchi et al., 2007), CK也以磷酸化依赖的方式稳定许多A型RR (To et al., 2007)。A型ARR负调控CK信号转导的机制是与B型ARR竞争AHP的磷酸化, 从而导致多步骤磷酸传递与B型ARR转录调控因子解离, 以减少其对基因表达的影响(Kieber and Schaller, 2014; Zubo and Schaller, 2020)。

2.4 细胞分裂素信号转导通路

细胞分裂素与HK的PAS结合, 导致受体的二聚作用并被激活, CK的信号转导通过类似于原核生物的His-Asp磷酸传递途径进行(Keshishian and Rashtotte, 2015; Zschiedrich et al., 2016)。在激活的受体ATP结合结构域中, ATP发生水解, 释放的磷酸基团与HisKA结构域中1个保守的His残基结合, 形成磷酸组氨酸(phosphohistidine)。然后, 活化(hot)的磷酸基在分子内被转移到接收器结构域中1个保守的Asp残基上, 依次与HPT相互作用, 将活化的磷酸基转移到HPT保守的His残基上。HPT携带该活化的磷酸基并转移到细胞核和磷酸化RR蛋白保守的Asp残基。最后, 磷酸化的B型RR能够与DNA结合, 激活CK靶基因的转录(图1, 图2) (Kieber and Schaller, 2018; Pe-

karova et al., 2018; Arkhipov et al., 2019)。

3 细胞分裂素对种子发育、休眠与萌发的调控

种子成熟过程中在母体植株上获得的休眠类型称为初生休眠(primary dormancy), 种子初生休眠的诱导和维持受植物激素调控(Shu et al., 2016; Nonogaki, 2017, 2019; 宋松泉等, 2020a)。研究表明, 种子中CK的水平和信号转导调控种子的发育、休眠与萌发(图1, 图3) (Kieber and Schaller, 2018; Tuan et al., 2019; Nguyen et al., 2020)。后熟(after-ripening)是一种释放种子休眠的方式, 也通过影响CK的水平和信号转导来调控种子的休眠与萌发(Chitnis et al., 2014)。

3.1 细胞分裂素对种子发育的影响

在玉米、水稻和大麦(*Hordeum vulgare*)中, CK的水平在开花后立即增加, 但随着种子成熟而降低(Lur and Setter, 1993)。在玉米和水稻等谷类作物的种子中, CK在发育的胚乳中较丰富, 可促进胚的细胞分裂(Rijavec and Dermastia, 2010)。Nguyen等(2020)利用HPLC-MS/MS测定了5个春小麦品种在5个种子发育阶段中CK代谢物水平的变化, 发现在前2个阶段(灌浆期至早、中期乳熟期)种子中CK总水平比后期3个阶段高3–5倍。5个品种中游离态CK (*tZ*和*cZ*)的水平在早期(阶段I和II)最丰富, 在后期3个阶段显著降低, 到第V阶段DZ和iP的水平低至可忽略不计。种子中的CK核苷(*tZR*、*cZR*和*iPR*)水平在5个发育阶段相对较低; *tZR*和*iPR*的水平在第I和II阶段较高, 随后显著降低; 但*cZR*在5个发育阶段均保持相对稳定。CK核苷酸*tZNT* (*trans*-zeatin nucleotide)的水平在前2个发育阶段的种子中占优势, 从第III阶段开始, *tZNT*的水平下降, 但*cZNT* (*cis*-zeatin nucleotide)和*iPNT* (*iP* nucleotide)的水平显著增高; 在5个发育阶段均能检测到*cZNT*, 5个品种中的*cZNT*水平在后期(阶段III–V)都超过前期(阶段I和II), 是前期的2倍; 而*iPNT*的水平在第III和IV阶段达到峰值, 到第V阶段完全消失。贮藏类型的CK主要是*cZ*型CK的O-糖基化结合物(O-glucosylated conjugate)以及一些*tZ*和DZ的衍生物; *cZ*-和DZ-葡糖苷在5个发育阶段都保持相对稳定,

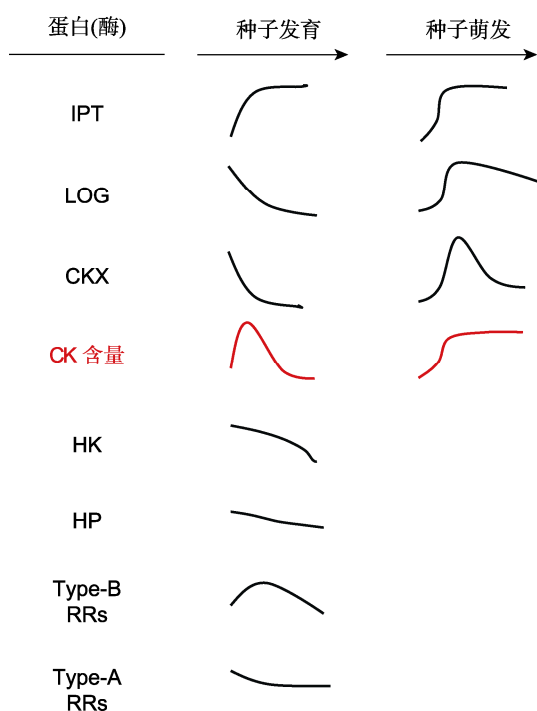


图3 种子发育和萌发过程中与细胞分裂素(CK)代谢和信号转导组分有关的蛋白(酶)的变化模式图(改编自Jameson et al., 2016; Tuan et al., 2019; Nguyen et al., 2020)

IPT: 异戊烯基转移酶; LOG: CK核苷5'-单磷酸磷酸核糖水解酶; CKX: CK氧化酶/脱氢酶; HK: 组氨酸激酶; HP: 组氨酸磷酸转移蛋白; Type-B RRs: 类型-B反应调控因子; Type-A RRs: 类型-A反应调控因子

Figure 3 The model of the change of proteins (enzymes) involved in cytokinin (CK) metabolism and signaling components during seed development and germination (modified from Jameson et al., 2016; Tuan et al., 2019; Nguyen et al., 2020)

IPT: Isopentenyltransferase; LOG: CK nucleoside 5'-monophosphate phosphoribohydrolase; CKX: CK oxidase/dehydrogenase; HK: Histidin (His) kinase; HP: His phosphotransfer protein; Type-B RRs: Type-B response regulators; Type-A RRs: Type-A response regulators

而*tZ*-葡萄糖苷(主要是*tZ*-9-葡萄糖苷)在第III阶段显著降低,到第V阶段继续减少直至几乎为0。

Day等(2008)利用激光捕获显微切割(laser capture microdissection, LCM)技术对授粉后4天的种子进行研究,在合胞体胚乳(syncytial endosperm)中发现与CK生物合成和信号转导相关的基因高丰度表达,尤其是*AtIPT8*在发育中的胚乳合点区表达丰度更高。Belmonte等(2013)研究了拟南芥种子发育过程中亚区域基因的表达,发现在种子发育的形态发生阶段

*IPT4*和*IPT8*的高丰度表达局限于合点胚乳(chalazal endosperm)。这些结果表明发育中的种子是CK生物合成的场所。小麦基因芯片(GeneChip)研究及其随后所选择基因的qRT-PCR分析表明,AC domain(休眠)和RL4452(非休眠)2种基因型种子的成熟都与胚和胚乳组织中注释为*TaIPT2-2*探针(基因)的增强表达有关;在这2种基因型的种子成熟过程中,*TaCKX4-3*和*TaCKX7-2*探针在胚中的表达水平下降,在胚乳中维持相似的水平(Tuan et al., 2019)。*IPT*编码催化CK生物合成限速步骤的酶,且CKX催化CK的失活(Sakakibara, 2006; Frébort et al., 2011),这些结果表明,种子成熟与胚和胚乳中CK水平的升高有关。相反,随着种子成熟,胚和胚乳组织中的iP水平显著降低,但与基因型无关;而*tZ*仅在2种基因型的胚组织中被检测到,且在AC Domain基因型中的含量比在RL4452基因型中更低(Tuan et al., 2019)。在2种基因型种子成熟过程中,胚和胚乳中iP水平的下降与胚*TaLOG8*和胚乳*TaLOG3*基因的表达水平下降有关(Tuan et al., 2019)。这些基因编码CK激活酶(LOG),该酶直接将失活的CK核苷酸转化为生物活性的游离态CK(Kurakawa et al., 2007)。此外,种子成熟时2种基因型的胚和胚乳组织中iP水平的下降以及AC Domain胚中*tZ*水平的显著下降与其相应组织中注释为*TaGLU4*探针的表达水平下降一致(Tuan et al., 2019)。*TaGLU4*编码一种通过羟基化作用从CK结合物中释放生物活性CK的酶(Cairns and Esen, 2010)。

Müller和Sheen(2008)创建了基于绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)的双组分感受器(two-component sensor, TCS::GFP)以监测种子中CK信号转导组分的转录。第1个明显的GFP信号出现在根干细胞胚根源(hypophysis)的16细胞阶段。在胚胎早期的心形胚阶段,所有已知磷酸传递信号转导组分的转录谱均表现出*AHK4*、*AHP2*、*AHP3*、*AHP5*以及A型和B型ARR基因的表达。上述研究为胚胎早期发生过程中可能的CK信号转导提供了最初的证据(Müller and Sheen, 2008)。

3.2 细胞分裂素在种子休眠与萌发中的作用

元宝枫(*Acer truncatum*)种子具有生理休眠,0.1–1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 激动素能促进干藏60天的种子萌发(Li et al., 2009)。黑黄檀(*Dalbergia fusca*)种子的萌发不

受 $0.1\text{--}100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA的影响, 但可被 $1\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA抑制, 被 $10\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA完全抑制(邓志军和宋松泉, 2008)。上述结果表明, CK对种子萌发的作用具有剂量效应和物种依赖性。Araújo等(2019)表明, 0.5 和 $0.75\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 激动素可显著提高蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*)种子的萌发率和萌发速率, 但有激动素存在时, 蒺藜苜蓿4天龄幼苗根系生长受到抑制。

在小麦种子成熟过程中, *TaAHK4*、*TaARR9*和*TaARR12*的表达水平在AC Domain和RL4452的胚中均表现下降, 这与iP和tZ的积累下降有关。然而, 在开花后20天, AC Domain胚中*TaARR12*的表达水平比RL4452更低(Tuan et al., 2019)。鉴于*TaARR12*属于B型ARR, 且作为CK反应的正调控因子起作用(Kieber and Schaller, 2018), *TaARR12*很可能抑制AC Domain胚中的CK反应, 从而在小麦种子成熟过程中起诱导休眠的作用。2种基因型胚乳中*TaAHP2*探针的表达随着种子成熟而下降。然而, 在种子成熟中期(开花后30天), *TaAHK4*探针在AC Domain胚乳中的表达水平比RL4452更低(Tuan et al., 2019)。由于AHK是CK的受体(Keshishian and Rashotte, 2015), 因此上述结果表明, RL4452对CK的反应敏感性增加, 从而抑制种子的休眠。另一方面, 在种子成熟的早期到中期(开花后20–30天), AC Domain胚乳中*TaARR9*的表达水平比RL4452更高(Tuan et al., 2019)。由于*TaARR9*属于负调控CK信号转导的A型ARR(Kieber and Schaller, 2018), 在成熟时具有深休眠的AC Domain种子胚乳对CK的反应敏感性降低, 其结果是成熟时休眠程度高。此外, AC Domain胚乳中AHK探针的表达下降也可能表明CK反应受到抑制, 从而诱导休眠。

在豌豆(*Pisum sativum*)种子萌发过程中, 3个*PsIPT*基因在吸胀后4小时的子叶中表达, 其表达丰度在种子萌发过程中升高, 在萌发后降低; *PsIPT*在新生的根和芽中的表达丰度最高(Jameson et al., 2016)。3个LOG基因在吸胀后4小时的子叶中表达量显著低于萌发后期, 但在根和芽中均有表达(Jameson et al., 2016)。PsCKX2的表达水平在吸胀后4小时的子叶中比其它4个PsCKX家族成员(*PsCKX1*、*PsCKX3*、*PsCKX5*和*PsCKX7*)更高, 但在萌发过程中变化很小。*PsCKX2*在发育的根和芽中维持组成型表达, 而*PsCKX1*、*PsCKX3*、*PsCKX5*和*PsCKX7*在

发育的芽和根中的表达显著增高(Jameson et al., 2016)。在吸胀后4小时的豌豆种子中能检测到游离态CK和CK核苷, 包括tZ和iP, 但DZ和cZ的水平很低; 未能检测到CK O-或者N-葡糖苷及其核苷酸。吸胀后2天, CK的水平显著增高, 主要是由于CK核苷酸特别是iPRMP (iP ribosyl monophosphate)的增加, cZRMP (cis-zeatin riboside monophosphate)和tZRMP增加较少。子叶和根中的CK水平在吸胀后11天达到峰值, 然后下降; 但芽中的CK水平在吸胀后5天最高, 然后下降, 主要是CK核苷酸水平的下降(Jameson et al., 2016)。这些结果表明, CK的生物合成和分解代谢与种子的萌发密切相关。

后熟(干藏)通过影响CK的水平和信号转导调控种子的休眠与萌发。小麦(AC domain)种子在吸胀24小时后萌发率为0, 吸胀7天后萌发率为11%, 表明种子具有休眠特性; 经后熟10个月的种子在吸胀24小时内的萌发率为95%, 表明后熟促进小麦种子的萌发(Chitnis et al., 2014)。利用基因芯片技术, Chitnis等(2014)发现, 与未后熟的种子相比, 后熟种子在吸胀过程中有1个LOG、3个GLU、1个CKX和2个ZOG基因显著上调; 在40个注释为CK信号转导基因的探针中, 只有1个编码伪反应调控因子(pseudo-response regulator)的APRR9基因在后熟种子的吸胀过程中下调2倍以上(Chitnis et al., 2014)。

3.3 细胞分裂素与其它植物激素的互作及在种子休眠与萌发中的作用

3.3.1 细胞分裂素与脱落酸在种子萌发中的拮抗作用

ABA抑制种子萌发, CK能逆转ABA对莴苣(*Lactuca sativa*)种子萌发的抑制作用(Kham, 1968)。 $1\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA对黑黄檀(*Dalbergia fusca*)种子萌发的抑制作用能够被 $0.001\text{--}0.1\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA所拮抗(邓志军和宋松泉, 2008)。过表达*AtIPT8*能降低*gim1* (*germination insensitive to ABA mutant 1*)突变体种子萌发对ABA的敏感性; *AtIPT8*的功能丧失导致*ipt8-1-ko*和*ipt8-2-ko*突变体产生ABA过敏性反应; 在*gim1*中, *AtIPT8*的过表达能够通过促进CK的生物合成来增强CK信号, 从而上调CK信号转导的转录调控因子(如A型ARR4–6)(Wang et al., 2011)。在野生型拟南芥Columbia-0背景下, ABA处理能够通过抑制*AtIPT3*和*AtIPT8*的表达水平减少CK的内源生物合成,

随后降低A型ARR4–6的表达水平(Wang et al., 2011)。此外,在萌发10天的*gim1*幼苗中,ABA处理也会抑制*AtIPT3*和*AtIPT8*的表达,降低A型ARR4–6的表达丰度(Wang et al., 2011)。值得注意的是,*gim1*突变体中CK水平的增高不是由于ABA生物合成的改变,而是降低了ABA和胁迫反应基因(如*ABI5* (*ABSCISIC ACID INSENSITIVE 5*))的表达水平(Wang et al., 2011)。

*ABI5*是一种碱性亮氨酸拉链转录因子(basic leucine zipper transcription factor),在ABA介导的抑制种子萌发和萌发后生长的调控中起重要作用(Guan et al., 2014; 宋松泉等, 2020b)。在种子萌发过程中,*ABI5*功能丧失能够降低ABA的敏感性,而*ABI5*功能获得能增加ABA的敏感性(Liu and Stone, 2010)。研究表明,*ABI5*与ARR4–6发生物理相互作用(Wang et al., 2011)。在*arr3/arr4/arr5/arr6*四突变体中,CK诱导的*ABI5*降低减少,这表明A型ARR蛋白与*ABI5*的结合可能在调控*ABI5*蛋白的稳定性中起重要作用(Guan et al., 2014)。由于A型ARR mRNA的稳定性水平和A型ARR蛋白的积累被CK正调控(Ren et al., 2009),因此,A型ARR-*ABI5*复合物可能抑制*ABI5*蛋白与蛋白酶体降解复合物的相互作用。

Guan等(2014)研究了CK对ABA信号转导组分表达水平的影响,包括*SnRK2* (*sucrose non-fermenting1-related kinase 2*)基因(*SnRK2.2*和*SnRK2.3*)、*ABFIAREB* (*ABA-responsive element binding factor/ABA-responsive element binding protein*)家族基因(*ABF1–4*)以及*ABI* (*ABI1–5*和*ABI8*)基因,发现CK对这些基因的表达无显著影响;大多数ABA调控基因的表达水平也不受CK影响,ABA诱导的*ABI5*的表达仅被CK轻微降低。用CK处理72–96小时后,*ABI5*蛋白几乎被完全降解,但*ABI5* mRNA被适度降低(Guan et al., 2014),这表明*ABI5*蛋白而不是*ABI5* mRNA的稳定性是CK介导ABA信号转导的主要调控步骤。CK诱导的*ABI5*蛋白的降解被蛋白酶体降解复合物专一性抑制剂MG132逆转。这些结果表明,CK调控的*ABI5*积累减少可能是由26S蛋白酶体途径介导(Liu and Stone, 2010; Guan et al., 2014)。

3.3.2 细胞分裂素与赤霉素、生长素和乙烯之间的互作

在种子萌发过程中,GA具有促进种子萌发、释放休眠

和拮抗ABA的作用(Nonogaki, 2014, 2017)。CK也通过促进GA诱导的 α -淀粉酶活性促进小麦种子萌发(Eastwood et al., 1969)。基因表达数据表明,CK上调B型ARR靶点,包括与GA生物合成有关的3个基因(*GA3OX1*、*GA2*和*GIM2*)的表达,下调*GID1b*受体的表达(Marín-de la Rosa et al., 2015)。

在黑暗条件下,1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 外源吲哚乙酸(indole acetic acid, IAA)处理显著延缓大豆(*Glycine max*)种子的萌发进程,且随着IAA浓度的增加其抑制作用增强(Shuai et al., 2017)。外源IAA也以剂量依赖的方式有效增强野生型拟南芥新鲜收获种子的休眠(Liu et al., 2013)。基因表达分析显示,生长素诱导A型ARR7和ARR15的转录,抑制拟南芥根发生过程中的CK反应;相反,在茎分生组织中,生长素抑制A型ARR的表达,增强这些细胞对CK的敏感性。CK抑制生长素生物合成基因*IAMT1*和*ILL6*的表达,诱导失活基因*GH3.6*的表达。CK还抑制*AUX1*生长素输出载体的表达,影响生长素从根尖向茎的运输,导致根细胞增殖减少。B型ARR的结合位点与编码生长素信号转导途径组分的基因(包括2个编码生长素受体的基因、10个*AUX/IAA*基因和4个*ARF*基因)有关。CK也诱导*AUX/IAA*基因*SHY2/IAA3*的表达,该基因作为生长素信号转导的负调控因子起作用(Zubo and Schaller, 2020)。

研究表明,种子的萌发能力与乙烯的产生有关,外源乙烯或乙烯利(ethe-rel, 乙烯释放剂)能解除种子的初生和次生休眠(second dormancy) (Corbineau et al., 2014)。CK通过转录和转录后机制激活ACC合酶(ACC synthase, ACS),促进乙烯的生物合成;乙烯的产生促进被CK抑制的暗生长幼苗的下胚轴伸长以及抑制根系的生长(Zdarska et al., 2015)。此外,B型ARR与许多影响乙烯信号转导的基因结合。尽管乙烯受体ETR2被CK下调表达,但CK调控大多数编码调节乙烯信号转导途径活性的元件,而不是途径本身。调节原件包括ARGOS基因家族的ARGOS和ARL以及TRP1、ETP和EBF基因。ARGOS是在受体水平起作用的跨膜蛋白,可使植物对乙烯去敏感;作为乙烯信号转导的正调控因子,TRP1可能通过与受体结合和干扰与CTR1的互作起作用;ETP和EBF基因分别编码参与EIN2和EIN3降解的F-box蛋白(Zubo and Schaller, 2020)。

此外, CK也与油菜素甾醇(brassinosteroid)、茉莉酸(jasmonic acid)和水杨酸(salicylic acid)产生广泛互作(crosstalk), B型ARR的结合位点与这些植物激素的生物合成、降解/失活、运输和信号转导的基因有关(Zubo et al., 2017; Zubo and Schaller, 2020)。

4 结束语

细胞分裂素对种子发育、休眠与萌发的调控通过生物活性CK水平和信号转导途径来实现(图1, 图3)(Hwang et al., 2012; Nguyen et al., 2020; Zubo and Schaller, 2020)。尽管近年来这些领域的研究已经取得了重要进展, 但仍然有一些科学问题需要进一步探索。例如, 已知生物活性CK可被CKX失活、通过cZOG可逆失活、被UGT不可逆失活以及通过βGlc重新活化(Frébort et al., 2011; Jameson and Song, 2016), 那么, 这些反应是否同时存在于同一物种的同一组织, 还是具有物种、组织和发育阶段的特异性? 在响应种子发育、休眠与萌发和环境变化时, 为了控制组织或细胞内的生物活性CK水平, 这些途径怎样被启动、运行和协调?

细胞分裂素的信号转导主要包括从ER膜定位的HK受体开始到核定位的B型RR的激活, 那么, 是什么赋予CK信号转导的特异性, 从而使不同类型的细胞产生不同的响应? 推测在细胞中可能存在特定亚组的CK信号转导元件以及调控CK反应基因表达的不同影响因子, 包括调控B型RR靶点选择的伴侣转录因子(Kieber and Schaller, 2018)。

最近Zubo和Schaller (2020)提出, CK能与其它植物激素发生广泛互作, 与这些植物激素生物合成、降解/失活、运输和信号转导有关的基因也是B型ARR的主要靶点。B型ARR包括ARR1、ARR2、ARR10–14和ARR18–21, 这些B型ARR是如何响应不同植物激素信号及其强度以及是否具有组织和细胞专一性还不清楚。结合基因功能获得与缺失的突变体, 利用相应的专一性抑制剂和组学研究体系, 包括转录组、蛋白质组、代谢组和表型组可能有助于解释上述科学问题, 进一步理解CK对种子发育、休眠与萌发调控的分子机制。

参考文献

邓志军, 宋松泉 (2008). ABA对黑黄檀种子萌发的抑制作用以

及其他植物激素对ABA的拮抗作用. 云南植物研究 30, 440–446.

邓志军, 宋松泉, 艾训儒, 姚兰 (2019). 植物种子保存和检测的原理与技术. 北京: 科学出版社. pp. 22–74.

宋松泉, 刘军, 黄荟, 伍贤进, 徐恒恒, 张琪, 李秀梅, 梁娟 (2020a). 赤霉素代谢与信号转导及其调控种子萌发与休眠的分子机制. 中国科学: 生命科学 50, 599–615.

宋松泉, 刘军, 徐恒恒, 刘旭, 黄荟 (2020b). 脱落酸代谢与信号传递及其调控种子休眠与萌发的分子机制. 中国农业科学 53, 857–873.

徐恒恒, 黎妮, 刘树君, 王伟青, 王伟平, 张红, 程红焱, 宋松泉 (2014). 种子萌发及其调控的研究进展. 作物学报 40, 1141–1156.

Araújo S, Pagano A, Dondi D, Lazzaroni S, Pinela E, Macovei A, Balestrazzi A (2019). Metabolic signatures of germination triggered by kinetin in *Medicago truncatula*. *Sci Rep* 9, 10466.

Arkhipov DV, Lomin SN, Myakushina YA, Savelieva EM, Osolodkin DI, Romanov GA (2019). Modeling of protein-protein interactions in cytokinin signal transduction. *Int J Mol Sci* 20, 2096.

Baskin CC, Baskin JM (2014). Seeds: Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination, 2nd edn. Amsterdam: Academic Press. pp. 5–77.

Belmonte MF, Kirkbride RC, Stone SL, Pelletier JM, Bui AQ, Yeung EC, Hashimoto M, Fei J, Harada CM, Munoz MD, Le BH, Drews GN, Brady SM, Goldberg RB, Harada JJ (2013). Comprehensive developmental profiles of gene activity in regions and subregions of the *Arabidopsis* seed. *Proc Natl Acad Sci USA* 110, E435–E444.

Bewley JD, Bradford KJ, Hilhorst HWM, Nonogaki H (2013). Physiology of Development, Germination and Dormancy, 3rd edn. New York: Springer. pp. 27–83.

Cairns JRK, Esen A (2010). β-glucosidases. *Cell Mol Life Sci* 67, 3389–3405.

Chen L, Zhao JQ, Song JC, Jameson PE (2020). Cytokinin dehydrogenase: a genetic target for yield improvement in wheat. *Plant Biotechnol J* 18, 614–630.

Chitnis VR, Gao F, Yao Z, Jordan MC, Park S, Ayele BT (2014). After-ripening induced transcriptional changes of hormonal genes in wheat seeds: the cases of brassinosteroids, ethylene, cytokinin and salicylic acid. *PLoS One* 9, e87543.

Corbineau F, Xia Q, Bailly C, El-Maarouf-Bouteau H (2014). Ethylene, a key factor in the regulation of seed

- dormancy. *Front Plant Sci* **5**, 539.
- Day RC, Herridge RP, Ambrose BA, Macknight RC** (2008). Transcriptome analysis of proliferating *Arabidopsis* endosperm reveals biological implications for the control of syncytial division, cytokinin signaling, and gene expression regulation. *Plant Physiol* **148**, 1964–1984.
- Deng Y, Dong HL, Mu JY, Ren B, Zheng BL, Ji ZD, Yang WC, Liang Y, Zuo JR** (2010). *Arabidopsis* histidine kinase CK11 acts upstream of histidine phosphotransfer proteins to regulate female gametophyte development and vegetative growth. *Plant Cell* **22**, 1232–1248.
- Eastwood D, Tavener RJA, Laidman DL** (1969). Sequential action of cytokinin and gibberellic acid in wheat aleurone tissue. *Nature* **221**, 1267.
- Feng J, Wang C, Chen QG, Chen H, Ren B, Li XM, Zuo JR** (2013). S-nitrosylation of phosphotransfer proteins represses cytokinin signaling. *Nat Commun* **4**, 1529.
- Frébort I, Kowalska M, Hluska T, Frébortová J, Galuszka P** (2011). Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation. *J Exp Bot* **62**, 2431–2452.
- Guan CM, Wang XC, Feng J, Hong SL, Liang Y, Ren B, Zuo JR** (2014). Cytokinin antagonizes abscisic acid-mediated inhibition of cotyledon greening by promoting the degradation of ABSCISIC ACID INSENSITIVE 5 protein in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **164**, 1515–1526.
- Hallmark HT, Rashotte AM** (2019). Review—cytokinin response factors: responding to more than cytokinin. *Plant Sci* **289**, 110251.
- Hirose N, Takei K, Kuroha T, Kamada-Nobusada T, Hayashi H, Sakakibara H** (2008). Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation. *J Exp Bot* **59**, 75–83.
- Hošek P, Hoyerová K, Kiran NS, Dobrev PI, Zahajská L, Filepová R, Motyka V, Müller K, Kamínek M** (2020). Distinct metabolism of *N*-glucosides of isopentenyladenine and *trans*-zeatin determines cytokinin metabolic spectrum in *Arabidopsis*. *New Phytol* **225**, 2423–2438.
- Hothorn M, Dabi T, Chory J** (2011). Structural basis for cytokinin recognition by *Arabidopsis thaliana* histidine kinase 4. *Nat Chem Biol* **7**, 766–768.
- Hou BK, Lim EK, Higgins GS, Bowles DJ** (2004). *N*-glucosylation of cytokinins by glycosyltransferases of *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* **279**, 47822–47832.
- Hutchison CE, Li J, Argueso C, Gonzalez M, Lee E, Lewis MW, Maxwell BB, Perdue TD, Schaller GE, Alonso JM, Ecker JR, Kieber JJ** (2006). The *Arabidopsis* histidine phosphotransfer proteins are redundant positive regulators of cytokinin signaling. *Plant Cell* **18**, 3073–3087.
- Hwang I, Sheen J, Müller B** (2012). Cytokinin signaling networks. *Annu Rev Plant Biol* **63**, 353–380.
- Jameson PE, Dhandapani P, Novak O, Song JC** (2016). Cytokinins and expression of *SWEET*, *SUT*, *CWINV* and *AAP* genes increase as pea seeds germinate. *Int J Mol Sci* **17**, 2013.
- Jameson PE, Song JC** (2016). Cytokinin: a key driver of seed yield. *J Exp Bot* **67**, 593–606.
- Kakimoto T** (2001). Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate: ATP/ADP isopentenyltransferases. *Plant Cell Physiol* **42**, 677–685.
- Kasahara H, Takei K, Ueda N, Hishiyama S, Yamaya T, Kamiya Y, Yamaguchi S, Sakakibara H** (2004). Distinct isoprenoid origins of *cis*- and *trans*-zeatin biosyntheses in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* **279**, 14049–14054.
- Keshishian EA, Rashotte AM** (2015). Plant cytokinin signaling. *Essays Biochem* **58**, 13–27.
- Khan AA** (1968). Inhibition of gibberellic acid-induced germination by abscisic acid and reversal by cytokinins. *Plant Physiol* **43**, 1463–1465.
- Kieber JJ, Schaller GE** (2014). Cytokinins. *Arabidopsis Book* **12**, e0168.
- Kieber JJ, Schaller GE** (2018). Cytokinin signaling in plant development. *Development* **145**, dev149344.
- Kurakawa T, Ueda N, Maekawa M, Kobayashi K, Kojima M, Nagato Y, Sakakibara H, Kyojuka J** (2007). Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature* **445**, 652–655.
- Li YJ, Cheng HY, Song SQ** (2009). Effects of temperature, after-ripening, stratification, and scarification plus hormone treatments on dormancy release and germination of *Acer truncatum* seeds. *Seed Sci Technol* **37**, 554–562.
- Liu HX, Stone SL** (2010). Abscisic acid increases *Arabidopsis* ABI5 transcription factor levels by promoting KEG E3 ligase self-ubiquitination and proteasomal degradation. *Plant Cell* **22**, 2630–2641.
- Liu XD, Zhang H, Zhao Y, Feng ZY, Li Q, Yang HQ, Luan S, Li JM, He ZH** (2013). Auxin controls seed dormancy through stimulation of abscisic acid signaling by inducing ARF-mediated *ABI3* activation in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**, 15485–15490.
- Liu ZN, Yuan L, Song XY, Yu XL, Sundaresan V** (2017). *AHP2*, *AHP3*, and *AHP5* act downstream of *CK11* in *Arabidopsis* female gametophyte development. *J Exp Bot* **68**, 3365–3373.
- Lomin SN, Krivosheev DM, Steklov MY, Arkhipov DV,**

- Osolodkin DI, Schmülling T, Romanov GA** (2015). Plant membrane assays with cytokinin receptors underpin the unique role of free cytokinin bases as biologically active ligands. *J Exp Bot* **66**, 1851–1863.
- Lomin SN, Myakushina YA, Kolachevskaya OO, Getman IA, Arkhipov DV, Savelieva EM, Osolodkin DI, Romanov GA** (2018). Cytokinin perception in potato: new features of canonical players. *J Exp Bot* **69**, 3839–3853.
- Lur HS, Setter TL** (1993). Role of auxin in maize endosperm development (timing of nuclear DNA endoreduplication, zein expression, and cytokinin). *Plant Physiol* **103**, 273–280.
- Mähönen AP, Higuchi M, Tormakangas K, Miyawaki K, Pischke MS, Sussman MR, Helariutta Y, Kakimoto T** (2006). Cytokinins regulate a bidirectional phosphorelay network in *Arabidopsis*. *Curr Biol* **16**, 1116–1122.
- Marín-de la Rosa N, Pfeiffer A, Hill K, Locascio A, Bhalariao RP, Miskolczi P, Gronlund AL, Wanchoo-Kohli A, Thomas SG, Bennett MJ, Lohmann JU, Blázquez MA, Alabadí D** (2015). Genome wide binding site analysis reveals transcriptional coactivation of cytokinin-responsive genes by DELLA proteins. *PLoS Genet* **11**, e1005337.
- Miyawaki K, Matsumoto-Kitano M, Kakimoto T** (2004). Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in *Arabidopsis*: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate. *Plant J* **37**, 128–138.
- Mok MC, Martin RC, Dobrev PI, Vanková R, Ho PS, Yonekura-Sakakibara K, Sakakibara H, Mok DWS** (2005). Topolins and hydroxylated thiazuron derivatives are substrates of cytokinin O-glucosyltransferase with position specificity related to receptor recognition. *Plant Physiol* **137**, 1057–1066.
- Müller B, Sheen J** (2008). Cytokinin and auxin interaction in root stem-cell specification during early embryogenesis. *Nature* **453**, 1094–1097.
- Nguyen HN, Perry L, Kisiala A, Olechowski H, Emery RJN** (2020). Cytokinin activity during early kernel development corresponds positively with yield potential and later stage ABA accumulation in field-grown wheat (*Triticum aestivum* L.). *Planta* **252**, 76.
- Nonogaki H** (2014). Seed dormancy and germination-emerging mechanisms and new hypotheses. *Front Plant Sci* **5**, 233.
- Nonogaki H** (2017). Seed biology updates—highlights and new discoveries in seed dormancy and germination research. *Front Plant Sci* **8**, 524.
- Nonogaki H** (2019). Seed germination and dormancy: the classic story, new puzzles, and evolution. *J Integr Plant Biol* **61**, 541–563.
- Pekárová B, Szmítowska A, Dopitová R, Degtjarik O, Židek L, Hejátko J** (2016). Structural aspects of multistep phosphorelay-mediated signaling in plants. *Mol Plant* **9**, 71–85.
- Pekarova B, Szmítowska A, Houser J, Wimmerova M, Hejátko J** (2018). Cytokinin and ethylene signaling. In: Hejátko J, Hakoshima T, eds. *Plant Structural Biology: Hormonal Regulations*. Cham: Springer. pp. 165–200.
- Ren B, Liang Y, Deng Y, Chen QG, Zhang J, Yang XH, Zuo JR** (2009). Genome-wide comparative analysis of type-A *Arabidopsis* response regulator genes by overexpression studies reveals their diverse roles and regulatory mechanisms in cytokinin signaling. *Cell Res* **19**, 1178–1190.
- Rijavec T, Dermastia M** (2010). Cytokinins and their function in developing seeds. *Acta Chim Slov* **57**, 617–629.
- Romanov GA, Lomin SN, Schmülling T** (2018). Cytokinin signaling: from the ER or from the PM? That is the question! *New Phytol* **218**, 41–53.
- Sakakibara H** (2006). Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. *Annu Rev Plant Biol* **57**, 431–449.
- Sakakibara H, Kasahara H, Ueda N, Kojima M, Takei K, Hishiyama S, Asami T, Okada K, Kamiya Y, Yamaya T, Yamaguchi S** (2005). *Agrobacterium tumefaciens* increases cytokinin production in plastids by modifying the biosynthetic pathway in the host plant. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 9972–9977.
- Sakano Y, Okada Y, Matsunaga A, Suwama T, Kaneko T, Ito K, Noguchi H, Abe I** (2004). Molecular cloning, expression, and characterization of adenylate isopentenyltransferase from hop (*Humulus lupulus* L.). *Phytochemistry* **65**, 2439–2446.
- Schaller GE, Doi K, Hwang I, Kieber JJ, Khurana JP, Kurata N, Mizuno T, Pareek A, Shiu SH, Wu P, Yip WK** (2007). Nomenclature for two-component signaling elements of rice. *Plant Physiol* **143**, 555–557.
- Shu K, Liu XD, Xie Q, He ZH** (2016). Two faces of one seed: hormonal regulation of dormancy and germination. *Mol Plant* **9**, 34–45.
- Shuai HW, Meng YJ, Luo XF, Chen F, Zhou WG, Dai YJ, Qi Y, Du JB, Yang F, Liu J, Yang WY, Shu K** (2017). Exogenous auxin represses soybean seed germination through decreasing the gibberellin/abscisic acid (GA/ABA) ratio. *Sci Rep* **7**, 12620.
- Spíchal L, Rakova NY, Riefler M, Mizuno T, Romanov**

- GA, Strnad M, Schmölling T** (2004). Two cytokinin receptors of *Arabidopsis thaliana*, CRE1/AHK4 and AHK3, differ in their ligand specificity in a bacterial assay. *Plant Cell Physiol* **45**, 1299–1305.
- Steklov MY, Lomin SN, Osolodkin DI, Romanov GA** (2013). Structural basis for cytokinin receptor signaling: an evolutionary approach. *Plant Cell Rep* **32**, 781–793.
- Strnad M** (1997). The aromatic cytokinins. *Physiol Plant* **101**, 674–688.
- Takei K, Sakakibara H, Sugiyama T** (2001). Identification of genes encoding adenylate isopentenyltransferase, a cytokinin biosynthesis enzyme, in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* **276**, 26405–26410.
- Taniguchi M, Sasaki N, Tsuge T, Aoyama T, Oka A** (2007). ARR1 directly activates cytokinin response genes that encode proteins with diverse regulatory functions. *Plant Cell Physiol* **48**, 263–277.
- Tarkowska D, Doležal K, Tarkowski P, Ástot C, Holub J, Fuksová K, Schmölling T, Sandberg G, Strnad M** (2003). Identification of new aromatic cytokinins in *Arabidopsis thaliana* and *Populus × canadensis* leaves by LC-(+) ESI-MS and capillary liquid chromatography/frit- fast atom bombardment mass spectrometry. *Physiol Plant* **117**, 579–590.
- To JPC, Deruère J, Maxwell BB, Morris VF, Hutchison CE, Ferreira FJ, Schaller GE, Kieber JJ** (2007). Cytokinin regulates type-A *Arabidopsis* response regulator activity and protein stability via two-component phosphorelay. *Plant Cell* **19**, 3901–3914.
- Tuan PA, Yamasaki Y, Kanno Y, Seo M, Ayele BT** (2019). Transcriptomics of cytokinin and auxin metabolism and signaling genes during seed maturation in dormant and non-dormant wheat genotypes. *Sci Rep* **9**, 3983.
- Wang YP, Li L, Ye TT, Zhao SJ, Liu Z, Feng YQ, Wu Y** (2011). Cytokinin antagonizes ABA suppression to seed germination of *Arabidopsis* by downregulating *ABI5* expression. *Plant J* **68**, 249–261.
- Wulfetange K, Lomin SN, Romanov GA, Stolz A, Heyl A, Schmölling T** (2011). The cytokinin receptors of *Arabidopsis* are located mainly to the endoplasmic reticulum. *Plant Physiol* **156**, 1808–1818.
- Wybouw B, De Rybel B** (2019). Cytokinin—a developing story. *Trends Plant Sci* **24**, 177–185.
- Zalabák D, Galuszka P, Mrízová K, Podlešáková K, Gu RL, Frébortová J** (2014). Biochemical characterization of the maize cytokinin dehydrogenase family and cytokinin profiling in developing maize plantlets in relation to the expression of cytokinin dehydrogenase genes. *Plant Physiol Biochem* **74**, 283–293.
- Zdarska M, Dobisová T, Gelová Z, Pernisová M, Dabrowski S, Hejátko J** (2015). Illuminating light, cytokinin, and ethylene signaling crosstalk in plant development. *J Exp Bot* **66**, 4913–4931.
- Zschiedrich CP, Keidel V, Szurmant H** (2016). Molecular mechanisms of two-component signal transduction. *J Mol Biol* **428**, 3752–3775.
- Zubko E, Adams CJ, Macháèková I, Malbeck J, Scollan C, Meyer P** (2002). Activation tagging identifies a gene from *Petunia hybrida* responsible for the production of active cytokinins in plants. *Plant J* **29**, 797–808.
- Zubo YO, Blakley IC, Yamburenko MV, Worthen JM, Street IH, Franco-Zorrilla JM, Zhang WJ, Hill K, Raines T, Solano R, Kieber JJ, Loraine AE, Schaller GE** (2017). Cytokinin induces genome-wide binding of the type-B response regulator ARR10 to regulate growth and development in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **114**, E5995–E6004.
- Zubo YO, Schaller GE** (2020). Role of the cytokinin-activated type-B response regulators in hormone crosstalk. *Plants* **9**, 166.

Research Progress in Seed Development, Dormancy and Germination Regulated by Cytokinin

Songquan Song^{1,2*}, Jun Liu^{2*}, Hua Yang³, Wenhui Zhang², Qi Zhang², Jiadong Gao²

¹*Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China;* ²*Guangdong Provincial Key Lab for Crop Germplasm Resources Preservation and Utilization/Agro-Biological Gene Research Center, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China;* ³*College of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China*

Abstract Seed germination is an important stage in the establishment, growth and propagation of plants, and plays a critical role in the life cycle of seed plants. Seed dormancy is formed during development, and reaches its peak at physiological maturity. The phytohormone regulation of seed dormancy and germination may be a highly conserved mechanism in seed plants. Cytokinin (CK) is one of the most important signal molecules in plants, and regulates many aspects of plant growth and development. The bioactive CK levels are controlled by a balance among biosynthesis, activation, deactivation, re-activation and degradation, and seed development, dormancy and germination are regulated by bioactive CK levels and signaling pathways. Here, we mainly summarize the research progresses of CK biosynthesis and catabolism, signaling, and regulation on seed development, dormancy and germination. In addition, we also propose some scientific questions that need further addressed in this field to provide some information for understanding the molecular mechanism of seed development, dormancy and germination regulated by CK.

Key words cytokinin, metabolism, molecular mechanism, seed dormancy and germination, signaling

Song SQ, Liu J, Yang H, Zhang WH, Zhang Q, Gao JD (2021). Research progress in seed development, dormancy and germination regulated by cytokinin. *Chin Bull Bot* **56**, 218–231.

* Authors for correspondence. E-mail: sqsong@ibcas.ac.cn; liujun@gdaas.cn

(责任编辑: 白羽红)