

ЦИТОКІНІНОКСИДАЗА/ДЕГІДРОГЕНАЗА ЯК ВАЖЛИВА МІШЕНЬ ДЛЯ ПІДВИЩЕННЯ ПРОДУКТИВНОСТІ РОСЛИН

С.Г. ХАБЛАК, С.І. СПІВАК, Н.Л. ПАСТУХОВА,
А.І. ЄМЕЦЬ, Я.Б. БЛЮМ

ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України», 04123, Україна, Київ, вул. Байди-Вишневецького, 2А

E-mail: sergeyhab211981@gmail.com, cellbio@cellbio.freenet.viaduk.net

В огляді розглянуто основні етапи біосинтезу і метаболізму цитокінінів з акцентом на важливу роль цитокініноксидази/дегідрогенази (СКО/СКХ) в деградації цитокінінів. У цьому контексті наведено аргументи щодо вирішального значення цього ферменту у підтримці збалансованого рівня цитокінінів у рослинах. Проаналізовано роль генів СКХ, що кодують цитокініноксидазу/дегідрогеназу, у формуванні стійкості рослин до абіотичних стресових чинників та їх врожайності. Охарактеризовані молекулярно-генетичні шляхи регуляції активності генів СКХ. Узагальнено результати досліджень щодо регуляції активності СКО/СКХ у підвищенні стійкості до абіотичних стресів і врожайності культур та описано біотехнологічні шляхи реалізації таких можливостей. Окремо окреслено перспективи пошуку речовин, що пригнічують активність СКО/СКХ, з метою створення препаратів для сільського господарства. Розглянуто перспективні хімічні інгібітори СКО/СКХ і їх ефекти на культурні рослини.

Ключові слова: цитокініни, біосинтез, деградація, цитокініноксидаза/дегідрогеназа, СКО/СКХ, гени СКХ, регуляція активності, абіотичні стреси, стійкість, урожайність.

Вступ

Цитокініни являють собою важливий клас рослинних гормонів, відкритих в лабораторії Ф. Скуга (США) в середині минулого століття завдяки своїй здатності індукувати клітинний поділ в культурі клітин рослин *in vitro* (Kakimoto, 2003; Miller et al, 1955). Цим гормонам належить важлива роль в регуляції всіх етапів онтогенезу рослини: від запліднення яйцеклітини до старіння і загибелі. Вони беруть участь у стимулюванні поділу клітин, диференціюванні хлоропластів, індукують стебловий морфогенез, затримують старіння листя, контролюють транспорт метаболітів, регулюють функціональну активність

наземних органів рослини (Li et al, 2021). Відповідно, цитокініни виконують важливі функції під час розвитку рослин та регулюють їх різні фізіологічні процеси, зокрема стійкість рослин до стресових чинників, мікробних патогенів, комах-шкідників і, зрештою, продуктивність культур (Hinsch et al, 2015; Akhtar et al, 2020; Andreas et al, 2020).

Цитокініни контролюють декілька параметрів, важливих для росту, архітектури та функцій кореня. Цитокініни є головним негативним регулятором подовження і розгалуження коренів, що було всебічно продемонстровано на прикладі арабідопсису (Ramireddy et al, 2014). У рису цитокініни також інгібують ініціацію бічних коренів, але стимулюють їх видовження (Debi et al, 2005). Рослини ячменю з надекспресією генів цитокініноксидази/дегідрогенази (СКО/СКХ) у коренях мають збільшену біомасу коренів, при цьому в їхніх листках значно підвищується вміст макро- і мікроелементів, знижується чутливість до довготривалої посухи, а насіння акумулює на 30 % більше цинку, ніж рослини дикого типу (Kosakivska et al, 2022). Подібний ефект спостерігається також у арабідопсису і тютюну, що свідчить про існування спільного для одно- і дводольних рослин еволюційно стабільного механізму живлення (Shimizu-Sato et al, 2009).

Цитокініни вже давно і не без підстав розглядають як основні гормони кореня, що утворюються переважно в його апексі і передають інформацію пагонам про його стан і про наявність важливих поживних елементів у ґрунті. Вважають, що цитокініни і ауксини створюють властивий саме рослинам різнонаправлений регуляторний контур, який багато в чому визначає швидкість біоплярного проліферативного росту і загальну архітектоніку пагону та кореневої системи (Ongaro, Leyser, 2008).

Біосинтез і метаболізм цитокінінів

Цитокініни як похідні аденіну існують у формі вільних основ (ізопентеніладенін, дигідро-зеатин, цис-зеатин і транс-зеатин), які є активними і зв'язуються з рецепторами, а також у вигляді їх неактивних рибозидів та нуклеотидів (Kakimoto, 2003). Гомеостаз цитокінінів у клітині підтримується поєднанням процесів біосинтезу (фермент ізопентенілтрансфераза (IPT)), деградації (фермент цитокініноксидаза (СКО), який розщеплює бічний ланцюг ізопреноїдних цитокінінів), та кон'югації (ферменти О-глюкозилтрансфераза (ZOG), який каталізує утворення мобільних О-глюкозидів, і β-глюкозидаза (GLU), яка розщеплює останні) (Krall et al, 2002). Відомо декілька форм біологічно активних цитокінінів (iP, tZ і cZ). Їх деградація відбувається за участю СКО/СКХ. У більшості рослин домінуючими формами цитокінінів є транс-зеатин та його похідні; вони проявляють найвищу активність у біотестах, мають найбільшу спорідненість до рецепторів, максимума їхнього вмісту співпадають з періодами інтенсивного росту (Astot et al, 2000).

Перший шлях біосинтезу цитокінінів – мевалонатний, що функціонує в рослинах, тваринах, грибах і бактеріях, локалізований у цитоплазмі та мітохондріях, відповідає за синтез попередників стеролів, сесквітерпенів та убіхінону і перетинається з біосинтезом гіберелінів та абцизової кислоти (АБК). Другий шлях – метилеритрітолфосфатний, ізопентеніладенін-незалежний або прямий, локалізований у пластидах, задіяний у продукуванні терпеноїдів, каротиноїдів, хлорофілів та пластохінону (Bilyeu et al, 2001; Brugiere et al, 2008). У вищих рослин головним первинним продуктом біосинтезу є неактивний нуклеотид ізопентеніладенін, утворення якого з АМФ і диметилалілдіфосфату каталізує ключовий у біосинтезі цитокінінів ензим ізопентенілтрансфераза (IPT). У рослин арабідопсису визначена родина генів, які кодують IPT (*AtIPT1* та *AtIPT3–AtIPT8*), субстратом якої є диметилалілдіфосфат. Застосування GFP дозволило продемонструвати пластидну локалізацію протеїнів *AtIPT1*, *AtIPT3* і *AtIPT5* (Brugiere et al, 2003).

СКО, яка каталізує розпад цитокініну, призводить до необоротної деградації ізопентеніладеніну, зеатину та їх рибозидів на одній ферментативній стадії шляхом окислювального розщеплення бічного ланцюга (Bilyeu et al, 2001). СКО – мономерні ферменти, що належать до групи FAD-вмісних оксидоредуктаз. Реакція СКО з цитокінінами протікає шляхом двоелектронного переносу від субстрату до кофактору флавінаденіндинуклеотиду (FAD) із супутнім утворенням імінного інтермедиату. Відповідні альдегідні та аденін/аденозинові фрагменти потім вивільняються шляхом гідролізу іміну. Повторне окислення FADH₂ відбувається після реакції з киснем з утворенням H₂O₂ або хінону. Через це і використовується назва ферменту «цитокініноксидаза/дегідрогеназа» (СКО/СКХ) (Galuszka et al, 2001).

Проаналізовані структури *ZmCKO1* у кукурудзи і *AtCKO7 Arabidopsis* демонструють дводоменну топологію з доменом, що зв'язує FAD, і доменом, що приєднує субстрат (Jones, Schreiber, 1997). Амінокислотні залишки активного центру достатньо консервативні, за винятком одного на вході до активного центру, де у положенні 381 можна знайти Glu (у випадку *ZmCKO1*), а також Asp, Ser, Gly, Val або Ala. Цікаво, що ці зміни відбуваються в кластерах і частково узгоджуються з положенням цих ферментів на філогенетичному дереві. Наприклад, *ZmCKO1* містять Val, а у випадку *AtCKO7* – Ser. Субстрати демонструють режим зв'язування «вилка-в-розетку» і не викликають жодних конформаційних змін після зв'язування в активному центрі ферменту, хоча залишок Glu-381 у *ZmCKO1* взаємодіє з субстратним аденіновим кільцем (Jones, Schreiber, 1997; Bilyeu et al, 2001).

Характеристика СКО/СКХ та родини генів, що їх кодують

У більшості рослин, вивчених досі, СКО кодується кількома генами. Перший ген (*ZmCKO1*) і відповідна мРНК були ідентифіковані у кукурудзи (*Zea mays*), і був виділений відповідний білок. На даний момент в геномній базі даних кукурудзи можна знайти щонайменше 13 передбачуваних послідовностей СКО (<http://maize.jcvi.org/>). Протягом останніх років за результатами повногеномних досліджень ідентифіко-

вано 7 генів *CKO* у *Arabidopsis* (*AtCKOs*) та 11 генів *CKO* у *Oryza sativa* (*OsCKOs*). Послідовності генів *CKO* також відомі для *Hordeum vulgare* (*HvCKOs*), *Pisum sativum* (*PsCKO1*), *Dendrobium* sp. (*DsCKO1*) та інших видів рослин, хоча геноми цих організмів не завжди ще повністю секвеновані. Ізотипи *CKO* в межах одного виду по-різному експресуються під час розвитку, а також, можливо, мають різну субстратну специфічність (Galuszka et al, 2007; Frébortová et al, 2007).

Сім ізотипів *СКХ*, гени яких наявні у геномі *A. thaliana*, відрізняються міжклітинною локалізацією та субстратною специфічністю, серед яких білок *AtCKX2* є найбільш активним та добре вивченим. З 13-ти генів *СКХ* кукурудзи ген *ZmCKX1* відіграє вирішальну роль у деградації цитокінінів. Кожен ізотип *СКХ* зазвичай відрізняється субстратною специфічністю, моделями просторової і часової експресії та субклітинною локалізацією (Todorova et al, 2006; Vaseva et al, 2008).

Філогенетичні угруповання *СКХ* генів можна в основному пояснити комбінацією локальної дуплікації генів і подіями дуплікації всього геному, які передують їх видоутворенню. На основі всебічного біоінформаційного та трансгенного аналізу рослин показано, що гени *СКХ* наземних рослин, швидше за все, походять від стародавнього хламідійного ендосимбіонту, залученого під час первинного ендосимбіозу. Гени *СКХ*, що зберігають еволюційно давні характеристики, називають «стародавніми» *СКХ*, а ті, що розширилися та функціонально розійшлися у покритонасінних, — «нестародавніми» *СКХ*. Експресія деяких нестародавніх *СКХ* швидко індукується впродовж 15 хв після зневоднення *Arabidopsis*, тоді як стародавні *СКХ* (*AtCKX7*) не реагують на посуху. Рослини тютюну з надлишковою експресією «нестародавніх *СКХ*» демонструють покращену посухостійкість і ріст коренів. Попередні дослідження мутантів показали, що нестародавні *СКХ* регулюють розвиток органів, зокрема квітів. Крім того, стародавні *СКХ* переважно розщеплюють такий цитокінін, як цис-зеатин (сZ), тоді як нестародавні *СКХ* переважно націлюються на N6-(Δ^2 -ізопентеніл) аденін (іP) і транс-зеатин (tZs) (Wang et al, 2020).

Припускають, що нестародавні *СКХ* та їхні специфічні субстрати — цитокініни іP/tZ-типу — регулюють розвиток органів покритонасінних рослин і відповіді на стресові чинники навколишнього середовища, тоді як стародавні *СКХ* та їх субстрат (сZs) підтримують основні клітинні функції. Еволюція та роль генів цитокініну в покритонасінних рослинах свідчить про те, що стародавні *СКХ* беруть участь у функціях клітини, тоді як нестародавні *СКХ* відіграють регуляторну роль. Стародавні гени *СКХ*, як правило, консервативно зберігаються в одній копії на вид, за винятком кількох з цих генів у покритонасінних рослин, які нещодавно зазнали подій поліплоїдизації. Навпаки, більшість нестародавніх генів *СКХ* зазнали значного розширення: 54 із 128 нестародавніх генів *СКХ* у покритонасінних, ймовірно, були результатом сегментарної дуплікації, а 20 — у результаті тандемної або проксимальної дуплікації (Wang et al, 2020).

Добре відомим шляхом передачі генів від бактерій до рослин є ендосимбіотичне перенесення генів з мітохондрій і пластид. Припускається пластидне походження рослинних генів *СКХ* через наявність гомологів цих генів у ціанобактерій. Втім, філогенетичний аналіз не підтверджує цю гіпотезу. Натомість, його результати свідчать про те, що *СКХ* наземних рослин найбільш тісно пов'язані з хламідійними послідовностями, тобто це свідчить все ж таки про хламідійне походження цих генів. Очевидно, що ген *СКХ* був перенесений з хламідійного ендосимбіонту до ядерного геному рослин і включений у їхній метаболізм цитокінінів (Dabravolski, Isayenkov, 2021).

Роль генів *СКХ* у визначенні врожайності і стійкості до абіотичних стресів

Цитокініни викликають інтерес у зв'язку з пошуками потенційних засобів захисту рослин через їх позитивний вплив на кушіння, розвиток квіток і насіння, затримку старіння та пом'якшення наслідків впливу стресових чинників. Підвищення рівнів цитокінінів уповільнює старіння, призводить до посиленого кушіння зернових. Інгібітори *СКХ* знижують рівні деградації цитокінінів у рослин, і цей ефект можна використовувати в сільському господарстві.

стві та культурі тканин рослин (Czajkowska et al, 2019). Цитокініни є також одним з ключових регуляторів формування кореневої системи. Підвищення рівня цитокінінів уповільнює диференціювання клітин кореневої меристеми. Цитокініни також регулюють відстань між бічними коренями. Таким чином, підвищення рівня цитокінінів або посилення цитокінінової сигналізації може призвести до зменшення розмірів кореневої системи (Galuszka et al, 2007; Gruhn, Heyl, 2013).

Підвищення рівня цитокінінів можна досягти шляхом деградації СКХ як основного ферменту, що дезактивує цей гормон, або шляхом стимулювання його біосинтезу. При вивченні надмірного прояву активності СКХ було показано, що рослини з надлишковою експресією цього ферменту виявляють підвищену стійкість до посухи та засолення. Рослини ячменю зі зниженим рівнем цитокінінів унаслідок надекспресії СКХ формують більш розвинену кореневу систему порівняно з немодифікованими рослинами, ліпше переносять посуху різної інтенсивності, підтримують вищий рівень обводненості і дають вищий врожай (Kosakivska et al, 2022).

Механізм підвищення посухостійкості злаків за рахунок зниження активності генів біосинтезу і деградації цитокінінів пов'язаний не тільки зі збільшенням розмірів кореневої системи, а й з впливом цих гормонів на гени біосинтезу і сигналіну АБК. У трансгенних рослин з підвищеним вмістом цитокінінів знижувалась індукція генів метаболізму АБК. Перекриття шляхів сигналіну АБК і цитокінінів, які носять антагоністичний характер, позначається на габітусі та посухостійкості рослин загалом і на провідності проростків та асиміляції CO₂ зокрема (Khablak, Abdullaeva, 2012).

Одна з найбільш важливих проблем під час роботи з цитокінінами полягає в тому, що вони мають протилежний вплив на ріст пагонів і коренів - сприяють росту пагонів і пригнічують ріст коренів, тому загальне підвищення рівня цитокінінів може сприяти росту пагонів при пригніченні росту коренів (Werner et al., 2003; Frebort et al, 2011). Цитокініни також уповільнюють старіння та посилюють кушіння зернових. Альтернативним підходом до маніпулювання рівнями цитокінінів в рослинах є

підвищення рівнів експресії генів СКХ у коренях і зменшення їх рівнів експресії у пагонах. Спрямовуючи експресію специфічних членів родини генів СКХ у коренях за рахунок використання специфічних для коренів промоторів, можна посилити в них пригнічення рівня цитокінінів, сприяти росту коренів і підвищувати стійкість до посухи та збільшити накопичення поживних речовин. Цікаво, що конститутивна (а не специфічна для коренів) експресія СКХ2 в ріпаку також призводить до посиленого росту коренів без жодного впливу на ріст пагонів, підвищеної стійкості до посухи та накопичення необхідних мікроелементів у листі (Kiebert, Schaller, 2018).

Бічні корені утворюють основну частину кореневої системи, як для поглинання води, так і для елементів живлення, розростаючись вбік та охоплюючи широку площу поверхні. Останні публікації свідчать про важливу роль, яку відіграють цитокініни у рості коренів злаків, стійкості до посухи та отриманні мікроелементів. Вирішальним у цьому було визнано інгібуючу роль, яку цитокініни відіграють у коренях, на відміну від стимулюючої ролі, яку вони відіграють у пагонах (Niemann et al, 2018).

Дослідження членів родини генів *TaCKX* є важливим у пшениці, оскільки посилений ріст коренів буде корисним для пшениці за умов зростання при обмеженій кількості води. Показано, що ген *TaCKX4* кластеризується з геном *OsCKX4* і знаходиться в іншому локусі, ніж ген *TaCKX2*, пов'язаний з урожайністю пшениці. Згідно з базою даних RNA-seq, ген *TaCKX4* слабо експресується в коренях, включаючи пазушні корені та апікальну меристему кореня на стадії трьох листків. Однак два члени родини генів *TaCKX*, які специфічно проявляються в коренях (*TaCKX7* і *TaCKX10*), експресуються на значно нижчому рівні порівняно з іншими членами родини генів (Chen et al, 2019).

Існує чітка відмінність членів родини генів *TaCKX* між тими, які сприяють урожайності зерна, і тими, які експресуються у вегетативних тканинах. Крім того, слід враховувати контрастні ефекти цитокінінів на корені та пагони. Зниження активності СКХ для сприяння збільшенню кількості насіння шляхом збільшення кількості колосків, не торкаючись цитокінінового середовища, яке могло б сприяти поси-

ленню кушіння або справді посиленню росту коренів, ймовірно, буде складним завданням (Ashikari et al, 2005). Припускають, що найкориснішими мутаціями стосовно підвищення врожайності, ймовірно, є мутації в гені *TaCKX1* і членах родини генів *CKX2.1* і *2.2*. Автори деяких досліджень пов'язують погане наповнення зерен рису з низьким вмістом цитокінінів, і зокрема, з вищими рівнями експресії ферменту *OsCKX* у різних його сортах. Сорти рису з мутаціями в гені *CKX2* мають підвищену кількість насіння, так само, як подвійні мутанти *ckx3,5 Arabidopsis*. В цілому, результати таких досліджень підтверджують роль *CKX* у негативному контролі кількості та розміру насіння (Chen et al, 2019).

Збільшення розміру зерна пов'язане з окультуренням злаків. Каріотиби пшениці, які містять делецію в гені *TaCKX2*, по суті обмежені місцевими давніми та сучасними сортами, що вказує на те, що делеція, пов'язана зі збільшенням маси 1000 зернин, ймовірно, була отримана порівняно недавно. Через вузьке місце окультурення локус *TaCKX6* має мало генетичних варіацій як у китайських старовинних, так і в культивованих сортах. Припускають, що функціональна дивергенція у пшениці відбулася в гені *CKX2*, оскільки ген рису *OsCKX2* пов'язаний з кількістю зерен, а ген *TaCKX2* пов'язаний з вагою зерен. Аналіз експресії в різних органах підтверджує таке припущення, при цьому ген *TaCKX2* експресується переважно в зернах і відносно менше в суцвіттях, тоді як ген *OsCKX2* в основному експресується в суцвіттях і квітах (Jablonski et al, 2021).

Рівні цитокінінів знижуються і за впливу низьких температур та гербіцидного стресу. За умов холодового стресу пригнічується біосинтез і сигналінг цитокінінів у рису. У пшениці зниження рівня цитокінінів супроводжується зменшенням концентрації гіберелінів та ауксинів, жасмонової і саліцилової кислот, зростає лише вміст АБК. Після 24 год дії холоду в міру аклімації рослин спостерігається тенденція до повернення балансу гормонів до вихідного стану, рівень цитокінінів поступово підвищується, а АБК знижується. Активність ферменту *CKX* відповідає за зміни пулу цитокінінів за несприятливих умов навколишнього середовища (Vaseva-Gemisheva et al, 2005).

Цитокініни задіяні в регуляції солестійкості злаків, про що свідчить, перш за все, їх позитивний вплив за умов екзогенного застосування на подолання негативного впливу солей. Засолення викликає зростання вмісту ендогенних цитокінінів у злаків. Сольовий і осмотичний стреси індукують активність генів *IPT* та репресують гени *CKX*, унаслідок чого в проростках кукурудзи накопичуються ендогенні цитокініни. У листках ячменю дуже швидко і різко зростає вміст зеатину вже через 2 год після засолення (Li et al, 2019).

У рослин сорту рису, чутливих до засолення, відмічена вища активність генів біосинтезу і сигналіngu цитокінінів, тоді як у рослин стійкого сорту спостерігається підвищена активність генів інактивації цих гормонів. Генетично модифіковані злаки з надсинтезом цитокінінів мають підвищену стійкість до впливу засолення. Наприклад, рослини рису з виключеним специфічним для суцвіть рису геном *OsCKX2*, які накопичували *транс*-зеатин, дигідрозеатин, ізопентеніладенін і кінетин у флоральній меристемі, вирізняються підвищеними рівнями солестійкості та урожайності, їхні листки містять більше фотосинтетичних пігментів і води, вони менше піддаються окиснювальному ушкодженню за умов сольового стресу (Panda et al, 2018).

Хоча пшениця є однією з найбільш вирощуваних зернових культур в усьому світі, проте особливості функціонування ферменту *CKX* цієї культури досліджені недостатньо порівняно з рисом і кукурудзою. В той же час результати цілеспрямованих змін активності *CKX* у зернових свідчать про явний вплив не лише на їх врожайність, але й на ріст і орієнтацію коренів, а також поглинання *Zn*, що також підкреслює необхідність відокремлення стимулюючого впливу на врожайність зерна від негативного впливу цитокінінів на ріст коренів і поглинання мінеральних речовин, зокрема *Zn* і *Fe* (Chen et al, 2019).

Трансгенні рослини *A. thaliana* та тютюну (*Nicotiana tabacum*) з посиленою специфічною для коренів деградацією цитокінінів утворюють більшу кореневу систему, тоді як ріст і розвиток пагона залишаються однаковими. Специфічне для коренів зменшення вмісту цитокінінів сприяє посиленню росту коренів, посу-

хостійкості та збагаченню листя мінеральними речовинами трансгенних ліній арабідопсису та тютюну (Werner et al, 2010).

Молекулярно-генетичні інструменти регуляції активності генів СКХ

Впродовж довгого часу після відкриття цитокінінів залишалося незрозумілим, що являє собою внутрішньоклітинна мішень їх дії, чи впливають вони безпосередньо на активність генів і, якщо так, то який механізм передачі цитокінінового сигналу. Однак тільки зараз почали з'ясовуватись основні закономірності молекулярної дії цитокінінів у регуляції різноманітних процесів розвитку рослин (Artner, Benkova, 2019). У *A. thaliana* ідентифіковані гени, що контролюють ключовий фермент біосинтезу цитокінінів — ізопентенілтрансферазу (*AtIPT1–AtIPT9*), відкриті мембранні рецептори (*AHK2*, *AHK3*, *AHK4/CRE1*), ідентифіковані гени первинної відповіді на гормон (*ARR*-гени групи А) і виділені білкові фактори транскрипції, які беруть участь в регуляції експресії генів вторинної відповіді (*ARR*-гени групи В). Однак багато аспектів молекулярних механізмів дії цитокінінів на фізіологічні процеси рослин ще мало вивчені і продовжуються активно досліджуватись (Arkhipov et al, 2019). На прикладі арабідопсису встановлено, що основним шляхом сприйняття цитокінінового сигналу клітиною є шлях за участю мембранних гістидинкіназ як рецепторів двокомпонентної системи для трансдукції сигналів на обмежений спектр генів первинної відповіді (Ren et al, 2009).

До теперішнього часу у *A. thaliana* отримані мутанти з пригніченими ефектами цитокінінів, які мають різноманітні порушення процесів розвитку. Це дозволило ідентифікувати гени інактивації і сигналізації фітогормонів даного класу. Такими генами є *ARABIDOPSIS HISTIDINE KINASE2 (AHK2)* і *ARABIDOPSIS HISTIDINE KINASE3 (AHK3)* (Hwang, Sheen, 2001). Гени *AHK2* і *AHK3* кодують сенсорні гістидинкінази *AHK2* і *AHK3*, які є мембранними рецепторами цитокінінів. Мутації *ahk2-5* і *ahk3-7* в генах *AHK2* і *AHK3* обумовлюють у рослин інактивування функцій мембранних рецепторів гістидинкіназ *AHK2* і

AHK3. В результаті цього у мутантних рослин арабідопсису знижується чутливість клітин до цитокінінів, і гени первинної відповіді перестають відкликатися на ці гормони (Kieber, 2008).

Цитокінінові рецептори арабідопсису *AHK2* і *AHK3* близькі за загальною структурою до рецептора *CRE1/AHK4*. В даний час вважається загальноприйнятим, що *A. thaliana* містить три близьких за будовою сенсорних гістидинкіназ — рецептори цитокінінів: *CRE1/AHK4*, *AHK2* і *AHK3*. Ці рецепторні гістидинкінази є інтегральними білками, які пронизують плазматичну мембрану двічі (*AHK4*) або тричі (*AHK2* і *AHK3*). За своєю структурою сенсорні гістидинкінази відносяться до білків так званої двокомпонентної системи передачі сигналів. Такі системи трансдукції сигналів ґрунтовно вивчені у бактерій, де вони широко представлені (Hwang et al, 2012).

У *A. thaliana* виявлено три родини рецепторних гістидинкіназ, перша з яких включає в себе рецептори етилену, друга — фоторецептори, в той час як третя об'єднує гістидинкінази *AHK*-родини, що включають в себе цитокінінові рецептори і осмосенсорні гістидинкінази (Schmülling, 2002). У своєму класичному вигляді двокомпонентна система складається з сенсорної гістидинкінази (рецептор) та регуляторної відповіді (транскрипційний фактор). Під впливом специфічного сигналу рецептор димеризується, фосфорилується і далі передає свій «гарячий» фосфат на залишок аспартату регулятора відповіді. Останній характеризується наявністю ДНК-зв'язуючого домену, за допомогою якого зв'язується в результаті активації з певною послідовністю ДНК у складі промотору і активує або, навпаки, репресує відповідний ген (Werner et al, 2001).

Подібні за структурою рецептори цитокінінів виявлені у еволюційно віддалених від арабідопсиса видів: кукурудзи і рису. У всіх цих рослин рецептори цитокінінів являють собою *AHK*-родину близькоспоріднених білків — мембранних гістидинкіназ, подібних сенсорним гістидинкіназам одноклітинних організмів. Відрізняються ці білки-рецептори між собою у різних видів рослин кількістю трансмембранних сегментів, які взаємодіють з CHASE-доменом (cyclase histidine kinase-associated sensing extracellular), котрий відповідає за впізнавання

і зв'язування цитокинінів (O'Keefe et al, 2011). У арабідопсиса і кукурудзи виявлені гени, що безпосередньо активуються цитокинінами. Одним з перших виявлених цитокинін-чутливих генів був ген так званої регуляторної відповіді, що отримав назву *ARR5 (ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR5)* (Rong et al, 2018).

Підвищення рівня цитокинінів у рослинах можна досягти двома можливими способами: додаванням природних або синтетичних цитокинінів або обмеженням їх активності шляхом використання відповідних інгібіторів. Сильні природні цитокиніни, такі як зеатин, можна використовувати на рослині лише одноразово, ефект від дії яких зникає через кілька днів. Позитивний вплив природних цитокинінів помітний на рослині недовго і, отже, вони неприйнятні з комерційної точки зору. Навпаки, синтетичні цитокиніни, такі як тидіазурон (TDZ), N-(2-хлор-4-піридил)-N'-фенілсечовина (CPPU) тощо, неефективні у своїх сигнальних аспектах і можуть викликати небажані побічні ефекти (Nisler et al, 2016).

Іншим способом підвищення рівня цитокинінів можна досягти регуляцією біосинтезу даних гормонів. Фізіологічно в рослинах рівень цитокинінів контролюється балансом чотирьох ферментів, з яких ізопентенілтрансфераза (IPT), яка використовує мевалонатний і метилеритритолфосфатний шлях, відповідає, головним чином, за метаболізм цитокинін в природі, тоді як за дезактивацію цитокиніну відповідає фермент СКО. СКО необоротно інактивує цитокиніни шляхом видалення бічного ланцюга N⁶-ізопрену з молекул цитокиніну (Zubko et al, 2002; Ye et al, 2006). Можна також припустити, що СКХ, будучи флавопротеїном, також бере участь у регуляції балансу цитокинінів, тим самим допомагаючи підтримувати їх гомеостаз. Повідомлялося, що ця регуляторна функція здебільшого відзначається для основних злаків, таких як ячмінь, кукурудза, рис та пшениця (Schmülling et al, 2003).

На генетичному рівні поширеність родини генів *СКХ* у рослинах змінюється у різних видів, причому ізоформи білків, що ними кодуються, відрізняються просторовими та часовими моделями експресії та субклітинною локалізацією. Деякі з них локалізовані в апопласті, вакуолях і цитозолі. Кількість генів *СКХ*, залу-

чених до інгібування цитокинінів, коливається від семи, як у *A. thaliana* і *Medicago sativa*, до восьми — у *Fragaria vesca*, одинадцяти — у *O. sativa* і *T. aestivum*, дванадцяти — у *Malus domestica*, тринадцяти — у *Z. mays* і 23 — у *Brassica napus* (Chen L et al, 2019). Ці гени можуть бути залучені у створення генетично модифікованих рослин з пригніченими рівнями експресії генів *СКХ*, що викликати різкі зміни у «пропорції органів», особливо морфології коренів і пагонів у рослин. Регуляція цитокинінів призводить до підвищення врожайності та стійкості до абіотичних стресів, що продемонстровано для рису, арабідопсису та ячменю. Через важливість таких досліджень розроблені та оптимізовані спектрофотометричні методи визначення у рослин активності СКХ (Frébort et al, 2002).

Окрім традиційної селекції, генна інженерія та редагування геному (CRISPR/Cas9) є одними з ефективних інструментів, за допомогою яких можна маніпулювати генами *СКХ*. Контроль ферменту СКХ за допомогою цих сучасних методів може призвести до цілеспрямованого покращення продуктивності рослин (Bae et al, 2007; Mandal et al, 2022).

На сьогоднішній день дослідники використовують як хімічні, так і молекулярно-біологічні підходи для інгібування СКХ, що, у свою чергу, покращує органогенез, стресостійкість та врожайність зерна у різних рослин. Наприклад, інгібуючі ефекти синтетичних цитокинінів CPPU або TDZ та їх похідних для кількох СКХ були продемонстровані в біотестах калюсної культури. Повідомляється, що N-(2-амінопіридин-4-іл)-N-фенілсечовина (APPU) більш істотно пригнічує СКХ1 кукурудзи, ніж CPPU. В іншому дослідженні автори застосували обчислювальні підходи для розробки та синтезу нових похідних TDZ, а саме 1-[1,2,3]тіадіазол-5-іл-3-(3-трифторметокси-феніл)сечовина (3FMTDZ) та 1-[2-(2-гідроксietил)феніл]-3-(1,2,3-тіадіазол-5-іл)сечовина (HETDZ), які продемонстрували 15-кратне зниження значень IC₅₀ порівняно з TDZ для AtCKX2 у *A. thaliana*, і ZmCKX1 і ZmCKX4 у кукурудзи. Екзогенне застосування 6-бензиламінопурину (BAP) до сорту рису OR-1918 значно покращило наповнення зерна, і це супроводжувалося значним зниженням експресії та активності

СКХ, особливо в базальних колосках, де активність СКХ була значно вищою, ніж у верхівкових колосках (Ashikari et al, 2005; Panda et al, 2018).

Хімічні інгібітори СКХ

Застосування екзогенних цитокінінів поки не знайшло широкого використання в сільськогосподарській практиці, швидше за все, через складність і мінливість їх ефектів. Проте було показано, що коли рівні ендогенних цитокінінів незначно підвищуються впродовж певних періодів, можна досягти покращення сільськогосподарських ознак. Наприклад, зниження або втрата функції гена *OsCKX2* у рису призводить до накопичення цитокінінів у меристемах суцвіть та збільшення кількості репродуктивних органів. Загальна кількість зерен на рослину зростає на ~30 %, не впливаючи на розмір зерна (Yeh et al, 2015).

Ключова роль СКХ у формуванні меристем суцвіть також підтверджена на *Arabidopsis*, де рослини з подвійним нокаутом *ckx* продемонстрували підвищення врожайності на 55 % через збільшення кількості насіння. Пригнічення експресії гена *HvCKX1* в ячмені супроводжувалося збільшенням кількості зерен на 31–43 %. Маса тисячі зерен була приблизно на 20 % вищою, а загальний урожай зерна з рослини був на 50–65 % вищим, ніж у контрольних рослин (Bartrina et al, 2011).

Добре відомі хімічні інгібітори СКХ були відкриті серед синтетичних цитокінінів ще в 1980-х роках. До хімічних інгібіторів ферменту СКХ відносяться дифенілсечовина, N-феніл-N'-(1,2,3-тіадіазол-5-іл)сечовина (тіадіазурон, TDZ), 1-(2-хлорпіридин-4-іл)-3-фенілсечовина (CPPU) та 1-(2,6-дихлорпіридин-4-іл)-3-фенілсечовина (DCPPU). Ці сполуки пригнічують деградацію природних цитокінінів, що каталізується СКХ. Ці сечовини, однак, класифікуються як цитокініни, оскільки їхні цитокінінові властивості явно переважають їхню інгібіторну активність щодо СКХ. Наприклад, TDZ інгібує СКХ лише у високих мікромолярних концентраціях, але виявляє сильні ефекти цитокініну в низькому наномолярному діапазоні (Nisler et al, 2016). В даний час TDZ і CPPU використовуються як важливі стимулятори росту для різних культур, таких як ківі та

диня. Крім того, TDZ є компонентом великої кількості агрохімічних продуктів, які використовуються для дефоліації бавовника в багатьох країнах. TDZ також відіграє незамінну роль у роботах з культурою тканин рослин завдяки своїй здатності індукувати утворення додаткових пагонів і сприяти проліферації пазушних пагонів (Nisler et al, 2020).

Показано, що похідні анілінопурину є потужними інгібіторами СКХ, які сприяють органогенезу *in vitro* і підвищують стресостійкість рослин до засолення і кадмію. Про позитивний вплив F-INCYDE (назва найактивнішого інгібітору 2-фтор-6-(3-метоксианілін)пурину), CPPU (1-(2-хлорпіридин-4-іл)-3-фенілсечовина) та інших перспективних інгібіторів СКХ на стійкість до теплового стресу та врожайність культур в польових умовах повідомлялося у багатьох дослідженнях (Kopečný et al, 2010; Aremu et al, 2014; van Voorthuizen et al, 2021).

Нещодавно на основі розроблених інгібіторів СКХ, 2-хлор-6-(3-метоксифеніламіно)пурину (INCYDE) і 2-фтор-6-(3-метоксифеніламіно)пурину (INCYDE-F) були отримані 2-хлор-6-(3-метоксианіліно)-9-(тетрагідропіран-2-іл)пурин (INCYDE-THP) і 2-фтор-6-(3-метоксианіліно)-9-(тетрагідропіран-2-іл)пурин (INCYDE-F-THP). Результати експериментів *in vitro* та *in vivo*, проведених з INCYDE-THP на різних видах рослин, засвідчили позитивний вплив препарату на ріст і розвиток цих рослин. Таким чином було знайдено нові перспективні інгібітори *AtCKX2*, позитивні ефекти яких також відображаються у підвищенні врожайності деяких культур, таких як пшениця, кукурудза та ріпак, а також деяких овочів, особливо при поливі. INCYDE-THP є багатообіцяючим кандидатом для листового підживлення рослин і обробки насіння, який може сприяти збільшенню біомаси пагонів/коренів (Voorthuizen et al, 2021).

Як вже відзначалось вище, на сьогоднішній день в різних видах рослин виявлені декілька родин генів СКХ, кількість яких змінюється залежно від виду рослин. Незважаючи на те, що кожен з ізоферментів СКХ каталізує подібну реакцію, різні їх варіанти віддають перевагу різним субстратам і зустрічаються в різних субклітинних компартментах. Отже, експресія кожного гена СКХ чітко змінюється, що, у свою

чергу, по-різному впливає на ріст, а також на розвиток тканин та органів. Наприклад, у *A. thaliana* СКХ1–СКХ6 містять високогідрофобний N-кінцевий домен, який служить цільовим сайтом для їх імпорту в ендоплазматичний ретикулум. СКХ7 в основному локалізу-

ється в цитозолі. Кілька гомологів СКХ також виявлено в апопласті кукурудзи, ячменю тощо (Holubová et al, 2018). Незалежно від субклітинної локалізації та відмінностей у послідовностях, усі СКХ містять СК- та FAD-зв'язувальні домени, розташовані поблизу C- та

Перспективні хімічні інгібітори СКХ

Хімічна речовина	Фізіологічний ефект	Посилання
1) дифенілсечовина, 2) тідіазурон (TDZ), 3) 1-(2-хлорпіридин-4-іл)-3-фенілсечовина (CPPU), 4) 1-(2,6-дихлорпіридин-4-іл)-3-фенілсечовина (DCPPU)	Пригнічують деградацію природних цитокінінів, що каталізується СКХ. Класифікуються як цитокініни, оскільки їх цитокінінові властивості явно переважають їх інгібіторну активність щодо СКХ. TDZ інгібує СКХ лише у високих мікромолярних концентраціях, але виявляє сильні ефекти цитокініну в низькому наномолярному діапазоні. TDZ і CPPU використовуються як важливі стимулятори росту для різних садових культур	Nisler et al, 2016
анілінопурин	Потужний інгібітор СКХ, який сприяє органогенезу <i>in vitro</i> і підвищує стійкість рослин до засолення і кадмію	van Voorthuizen et al, 2021
F-INCYDE (2-фтор-6(3-метоксифеніламіно)пурин	Впливає на стійкість до теплового стресу, пересаджування та врожайності рису. Оброблені рослини мають підвищення врожайності зерна на 8,8 %	van Voorthuizen et al, 2021
N-(2-амінопіридин-4-іл)-N'-фенілсечовина (APPU)	Пригнічує активність СКХ1 кукурудзи	Panda et al, 2018
1) 1-[1,2,3]тіадіазол-5-іл-3-(3-трифторметокси-феніл)сечовина (3FMTDZ), 2) 1-[2-(2-гідроксietил)феніл]-3-(1,2,3-тіадіазол-5-іл)сечовина (HETDZ)	15-разове зниження значень IC ₅₀ порівняно з TDZ для AtCKX2 у <i>A. thaliana</i> і ZmCKX1 і ZmCKX4 у <i>Z. mays</i>	Panda et al, 2018
1) 1-(2-хлорпіридин-4-іл)-3-(3-метоксифеніл)сечовина, 2) 1-(2,6-дихлорпіридин-4-іл)-3-(3-метоксифеніл)сечовина, 3) 2-[3-(3,5-дихлорфеніл)уреїдо]бензойна кислота, 4) 1-[2-(аміноетил)феніл]-3-(3,5-дихлорфеніл)сечовина, 5) 2-{2-[3-(3,5-дихлорфеніл)уреїдо]феніл}ацетамід, 6) 1-[2-(1-гідроксietил)феніл]-3-[3-(трифторметокси)феніл]сечовина	Інгібує 3 ізоферменти СКХ у кукурудзи (ZmCKX1, ZmCKX8 і ZmCKX4)	Nisler et al, 2020
1-[2-(2-гідрокси-етил)-феніл]-3-(3-трифторметокси-феніл)-сечовина	Підвищує стресостійкість, урожайність насіння арабідопсису, а також покращує врожайність ячменю, ріпаку та пшениці в польових умовах	Nisler et al, 2016; Nisler et al, 2020

N-кінців відповідно. Серед цих двох доменів FAD-зв'язуючий домен є більш еволюційно консервативним. Повідомляється, що неправильне згортання C-кінця, дезактивує AtCKX1 у *A. thaliana* (Jabłoński et al, 2020).

СКХ розщеплює цитокініни шляхом розкладання його N6-заміщеного бічного ланцюга, який, у свою чергу, продукує ненасичений альдегід 3-метил-2-бутеналь і аденін. Однак інгібування СКХ за допомогою різних хімічних і молекулярних підходів викликає агрегацію цитокінінів в різних тканинах, що, у свою чергу, підвищує врожайність та стійкість до абіотичних стресів, а також затримує старіння. Крім того, це покращує регенеративну здатність експлантів різних видів сільськогосподарських культур у культурі тканин, що необхідно для мікророзмноження (Gasparis et al, 2019). Оскільки знижена експресія фермента СКХ пов'язана з підвищенням урожайності та органогенезом *in vitro*, то ці ефекти спонукають знайти відповідні інгібітори СКХ, які можуть допомогти підвищити врожайність та покращити регенерацію в культурі тканин різних культурних рослин (Aremiti et al, 2014).

Продемонстровано, що сполуки сечовини відіграють важливу роль під час їх зв'язування з активним центром СКХ (Nisler et al, 2016). Nisler et al (2020) синтезували 32 нових інгібітори СКХ, отриманих в основному з дифенілсечовини, CPPU та DCPPU, і перевірили їх біологічну активність у біотестах з СКХ, а також у культурі тканин рослин (таблиця). Щоб вивчити взаємозв'язок «структура-функція», використовували три ферменти СКХ з кукурудзи (ZmCKX1, ZmCKX8 і ZmCKX4) і один з *A. thaliana* (AtCKX2). Крім того, зв'язувальну активність найкращих інгібіторів перевіряли з ZmCKX8 і ZmCKX4 за допомогою рентгенівської кристалографії. Результати показали, що синтезованим сполукам не притаманна цитокінінова активність, і більшість з них характеризуються подібними структурними інгібіторними зв'язками щодо ZmCKX1 та AtCKX2. Однак AtCKX2 був трохи менш чутливим до інгібування та більш селективним порівняно з ZmCKX1. Шість сполук, а саме 1-(2-хлор-піридин-4-іл)-3-(3-метоксифеніл)сечовина, 1-(2,6-дихлорпіридин-4-іл)-3-(3-метокси-феніл)сечовина, 2-[3-(3,5-дихлорфеніл)

уреїдо]бензойна кислота, 1-[2-(аміноетил)феніл]-3-(3,5-дихлорфеніл)сечовина, 2-{2-[3-(3,5-дихлорфеніл)уреїдо]феніл}ацетамід та 1-[2-(1-гідроксиетил)феніл]-3-[3-(три-фторометокси)феніл]сечовина показали краще інгібування у випадку ZmCKX1. Незважаючи на присутність неконсервованого глутамату як у ZmCKX1 (E381), так і в ZmCKX8 (E372), який сприяє зв'язуванню менших субстратів, ZmCKX8 продемонстрував значно різну чутливість до кожного інгібітора. Одна сполука, а саме 1-[2-(2-гідроксиетил)-феніл]-3-(3-трифторметоксифеніл)-сечовина, значно підвищувала стресостійкість арабідопсису та урожайність його насіння, а також покращувала врожайність ячменю, ріпаку та пшениці в польових умовах (Nisler et al, 2020).

Заключення

Таким чином, у ряді проведених досліджень продемонстровано, що цитокініни здатні не тільки безпосередньо збільшувати урожайність насіння, вони також є суттєвим компонентом реакції рослин на екологічні стреси. Завдяки їх визнаному впливу на збільшення кількості та розміру насіння, а також пом'якшенню наслідків стресу та дефіциту мінеральних поживних речовин, цитокініни цілком можуть бути гормонами, які лежить в основі наступної «зеленої революції».

У контексті адаптації до абіотичних стресів разом із покращенням урожаю рослин важлива роль належить регуляції активності СКХ — ключового ферменту метаболізму цитокінінів. Застосування інгібіторів ферменту СКХ як успішного та дієвого засобу для покращення стійкості до абіотичних стресів має великий потенціал для підвищення врожайності різноманітних сільськогосподарських культур, включаючи зернові. Однак відповідний рівень дозування, а також «рентабельність» цих препаратів ще належить оцінити на комерційному рівні, що вимагає підвищеної уваги дослідників у цій галузі.

У майбутньому інгібітори СКХ можна буде розглядати як гормональні препарати для рослин, а дослідження можуть зосередитися на розумінні молекулярного механізму взаємодії ферменту СКХ з іншими гормонами, такими як жасмонова кислота, саліцилова кислота,

етилен, абсцизова кислота та інші, що сприятиме кращому розумінню клітинних механізмів дії різних чинників абіотичного стресу.

Дотримання етичних стандартів. Ця стаття не містить будь-яких досліджень з використанням тварин і людей в якості об'єктів.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність будь-якого конфлікту інтересів.

Фінансування. Робота виконана в рамках бюджетного проєкту Нац. акад. наук України (номер державної реєстрації 0120U100937, 2020-24).

CYTOKININ OXIDASE/DEHYDROGENASE AS AN IMPORTANT TARGET FOR INCREASING PLANT PRODUCTIVITY

S.G. Khablak, S.I. Spivak, N.L. Pastukhova, A.I. Yemets, Ya.B. Blume

Institute of Food Biotechnology and Genomics of Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 04123, 2a Baidy-Vyshnevetskoho St., Kyiv

E-mail: sergeyhab211981@gmail.com, cellbio@cellbio.freenet.viaduk.net

The review examines the main stages of cytokinin biosynthesis and metabolism with an emphasis on the important role of cytokinin oxidase/dehydrogenase (CKO/CKX) in cytokinin degradation. In this context, arguments are made for the crucial importance of this enzyme in maintaining a balanced level of cytokinins in plants. The role of *CKX* genes encoding cytokinin oxidase/dehydrogenase in determining plant resistance to abiotic stress factors and their yield was analyzed. The molecular genetic ways of regulating the activity of *CKX* genes are characterized. The results of research on the regulation of CKO/CKX activity in increasing the resistance to abiotic stress and crop yield are summarized and the biotechnological ways of realizing such opportunities are described. Prospects for finding substances that inhibit CKO/CKX activity with the aim of creating preparations for agriculture are outlined separately. Prospective chemical inhibitors of CKO/CKX and their effects on cultivated plants are considered.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

Akhtar SS, Mekureyaw MF, Pandey C, Roitsch T (2020) Role of cytokinins for interactions of plants with microbial pathogens and pest insects. *Front Plant Sci* 10:1777. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01777>
Andreas P, Kisiala A, Emery RJN et al (2020) Cytokinins are abundant and widespread among insect spe-

cies. *Plants* 9:208. <https://doi.org/10.3390/plants9020208>
Aremu AO, Masondo NA, Sunmonu TO et al (2014) A novel inhibitor of cytokinin degradation (INCYDE) influences the biochemical parameters and photosynthetic apparatus in NaCl-stressed tomato plants. *Planta* 240:877–889. <https://doi.org/10.1007/s00425-014-2126-y>
Arkhipov DV, Lomin SN, Myakushina YA et al (2019) Modeling of protein–protein interactions in cytokinin signal transduction. *Int J Mol Sci* 20:2096–2118. <https://doi.org/10.3390/ijms20092096>
Artner C, Benkova E (2019) Ethylene and cytokinin: partners in root growth regulation. *Mol Plant* 12:1312–1314. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2019.09.003>
Ashikari M, Sakakibara H, Lin S et al (2005) Cytokinin oxidase regulates rice grain production. *Science* 309:741–745. <https://doi.org/10.1126/science.1113373>
Astot C, Dolezal K, Nordstrom A et al (2000) An alternative cytokinin biosynthesis pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:14778–14783. <https://doi.org/10.1073/pnas.260504097>
Bae E, Bingman CA, Bitto E et al (2007) Crystal structure of *Arabidopsis thaliana* cytokinin dehydrogenase. *Proteins Struct Funct Bioinforma* 70:303–306. <https://doi.org/10.1002/prot.21678>
Bartrina I, Otto E, Strnad M et al (2011) Cytokinin regulates the activity of reproductive meristems, flower organ size, ovule formation, and thus, seed yield in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 23:69–80. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.079079>
Bilyeu KD, Cole JL, Esparza TJ et al (2001) Molecular and biochemical characterization of a cytokinin oxidase from maize. *Plant Physiol* 125:378–386. <https://doi.org/10.1104/pp.125.1.378>
Blume R, Yemets A, Korkhovi V et al (2022) Genome-wide identification and analysis of the cytokinin oxidase/dehydrogenase (*ckx*) gene family in finger millet (*Eleusine coracana*). *Front. Genet.* 13:963789. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.963789>
Brugière N, Bohn J, Humbert S et al (2008) A member of the maize isopentenyl transferase gene family, *Zea mays* isopentenyl transferase 2 (*ZmIPT2*), encodes a cytokinin biosynthetic enzyme expressed during kernel development. *Plant Mol Biol* 67:215–229. <https://doi.org/10.1007/s11103-008-9312-x>
Brugière N, Shuping J, Hanke S et al (2003) Cytokinin oxidase gene expression in maize is localized to the vasculature, and is induced by cytokinins, abscisic acid, and abiotic stress. *Plant Physiol* 132:1228–1240. <https://doi.org/10.1104/pp.102.017707>
Chen L, Zhao J, Song J, Jameson PE (2020) Cytokinin dehydrogenase: A genetic target for yield improvement in wheat. *Plant Biotechnol J* 18:614–630. <https://doi.org/10.1111/pbi.13305>

- Czajkowska BI, Finlay CM, Jones G, Brown TA (2019) Diversity of a cytokinin dehydrogenase gene in wild and cultivated barley. PLoS ONE 14: e0225899. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.225899>
- Dabravolski SA, Isayenkov SV (2021) Evolution of the cytokinin dehydrogenase (CKX) domain. J Mol Evol 89: 665–677. <https://doi.org/10.1007/s00239-021-10035-z>
- Debi BR, Taketa S, Ichii M (2005) Cytokinin inhibits lateral root initiation but stimulates lateral root elongation in rice (*Oryza sativa*). J Plant Physiol 162 (5):507–515. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2004.08.007>
- Frébort I, Kowalska M, Hluska T et al (2011) Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation. J Exp Bot 62:2431–2452. <https://doi.org/10.1093/jxb/err004>
- Frébort I, Šebela M, Galuszka P et al (2002) Cytokinin oxidase/cytokinin dehydrogenase assay: optimized procedures and applications. Anal Biochem 306:1–7. <https://doi.org/10.1006/abio.2002.5670>
- Frébortová J, Galuszka P, Werner T et al (2007) Functional expression and purification of cytokinin dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana* (AtCKX2) in *Saccharomyces cerevisiae*. Biol Plant 51:673–682. <https://doi.org/10.1007/s10535-007-0141-6>
- Galuszka P, Frébort I, Šebela M et al (2001) Cytokinin oxidase or dehydrogenase? Mechanism of cytokinin degradation in cereals. Eur J Biochem 268:450–461. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2001.01910.x>
- Galuszka P, Popelková H, Werner T et al (2007) Biochemical characterization of cytokinin oxidases/dehydrogenases from *Arabidopsis thaliana* Expressed in *Nicotiana tabacum* L. J Plant Growth Regul 26:255–267. <https://doi.org/10.1007/s00344-007-9008-5>
- Gasparis S, Przyborowski M, Kała M, Nadolska-Orczyk A (2019) Knockout of the HvCKX1 or HvCKX3 gene in barley (*Hordeum vulgare* L.) by RNA-Guided Cas9 nuclease affects the regulation of cytokinin metabolism and root morphology. Cells 8:782. <https://doi.org/10.3390/cells8080782>
- Gruhn N, Heyl A (2013) Updates on the model and the evolution of cytokinin signaling. Curr Opin Plant Biol 16:569–574. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2013.09.001>
- Hinsch J, Vrabka J, Oeser B et al (2015) *De novo* biosynthesis of cytokinins in the biotrophic fungus *Claviceps purpurea*: *De novo* cytokinin synthesis by a fungal pathogen. Environ Microbiol 17:2935–2951. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12838>
- Holubová K, Hensel G, Vojta P et al (2018) Modification of barley plant productivity through regulation of cytokinin content by reverse-genetics approaches. Front Plant Sci 871:1676. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01676>
- Hwang I, Sheen J (2001) Two-component circuitry in Arabidopsis cytokinin signal transduction. Nature 413:383–389. <https://doi.org/10.1038/35096500>
- Hwang I, Sheen J, Müller B (2012) Cytokinin signaling networks. Annu Rev Plant Biol 63:353–380. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105503>
- Jabłoński B, Ogonowska H, Szala K et al (2020) Silencing of TaCKX1 mediates expression of other TaCKX genes to increase yield parameters in wheat. Int J Mol Sci 21:4809. <https://doi.org/10.3390/ijms21134809>
- Jablonski B, Szala K, Przyborowski M et al (2021) TaCKX2.2 genes coordinate expression of other TACKX family members, regulate phyto-hormone content and yield-related traits of wheat. Int J Mol Sci 22(8):4142. <https://doi.org/10.3390/ijms22084142>
- Jones RJ, Schreiber BMN (1997) Role and function of cytokinin oxidase in plants. Plant Growth Regul 23:123–134. <https://doi.org/10.1023/A:1005913311266>
- Kakimoto T (2003) Biosynthesis of cytokinins. J Plant Res 116:233–239. <https://doi.org/10.1007/s10265-003-0095-5>
- Khablak SG, Abdullaeva YA (2012) Features of the structure and development of root systems in plants of mutant lines ahk2-5 and ahk3-7 *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Bulletin of the Odessa National University. Series Biology 17:58–68.
- Kieber JJ (2008) Cytokinin signaling: two-components and more. Trends Plant Sci 13:85–92. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.11.005>
- Kieber JJ, Schaller GE (2018) Cytokinin signaling in plant development. Development 145:149344. <https://doi.org/10.1242/dev.149344>
- Kopečný D, Briozzo P, Popelková H et al (2010) Phenyl- and benzylurea cytokinins as competitive inhibitors of cytokinin oxidase/dehydrogenase: a structural study. Biochimie 92:1052–1062. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.05.006>
- Kosakivska IV, Vedenicheva NP, Babenko LM et al. (2022) Exogenous phytohormones in the regulation of growth and development of cereals under abiotic stresses. Mol Biol Rep 49:617–628. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06802-2>
- Krall L, Raschke M, Zenk MH, Baron C (2002) The Tzs protein from *Agrobacterium tumefaciens* C58 produces zeatin riboside 5'-phosphate from 4-hydroxy-3-methyl-2-(E)-butenyl diphosphate and AMP. FEBS Lett 527:315–318. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)03258-1](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)03258-1)
- Li S, An Y, Hailati S et al (2019) Overexpression of the cytokinin oxidase/dehydrogenase (CKX) from *Medicago sativa* enhanced salt stress tolerance of

- Arabidopsis. J Plant Biol 62:374–386. <https://doi.org/10.1007/s12374-019-0141-z>
- Li SM, Zheng HX, Zhang XS et al (2021) Cytokinins as central regulators during plant growth and stress response. Plant Cell Rep 40:271–282. <https://doi.org/10.1007/s00299-020-02612-1>
- Mandal S, Ghoraiet M et al (2022) Cytokinins: a genetic target for increasing yield potential in the CRISPR era. Front Genet 13. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.883930>
- Miller CO, Folke KS, Saltza MHV, Strong FV (1955) Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. J Am Chem Soc 77(5):1392. <https://doi.org/10.1021/ja01610a105>
- Niemann MCE, Weber H, Hluska T et al (2018) The cytokinin oxidase/dehydrogenase CKX1 is a membrane-bound protein requiring homooligomerization in the endoplasmic reticulum for its cellular activity. Plant Physiol 176:2024–2039. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00925>
- Nisler J, Kopečný D, Končítiková R et al (2016) Novel thidiazuron-derived inhibitors of cytokinin oxidase/dehydrogenase. Plant Mol Biol 92(1–2):235–248. <https://doi.org/10.1007/s11103-016-0509-0>
- Nisler J, Kopečný D, Pěkná Z et al (2020) Diphenylurea-derived cytokinin oxidase/dehydrogenase inhibitors for biotechnology and agriculture. J Exp Bot 72:355–370. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa437>
- O’Keefe D, Song J, Jameson PE (2011) Isopentenyl transferase and cytokinin oxidase/dehydrogenase gene family members are differentially expressed during pod and seed development in Rapid-cycling *Brassica*. J Plant Growth Reg 30:92–99. <https://doi.org/10.1007/s00344-010-9171-y>
- Ongaro V, Leyser O (2008) Hormonal control of shoot branching. J Exp Bot 59:67–74. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm134>
- Panda BB, Sekhar S, Dash SK et al (2018) Biochemical and molecular characterisation of exogenous cytokinin application on grain filling in rice. BMC Plant Biol 18:89. <https://doi.org/10.1186/s12870-018-1279-4>
- Pils B, Heyl A (2009) Unraveling the evolution of cytokinin signaling. Plant Physiol 151:782–791. <https://doi.org/10.1104/pp.109.139188>
- Radchuk V, Radchuk R, Pirko Y et al (2012) A somaclonal line SE7 of finger millet (*Eleusine coracana*) exhibits modified cytokinin homeostasis and increased grain yield. J Exp Botany 63:5497–5506. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers200>
- Ramireddy E, Chang L, Schmülling T (2014) Cytokinin as a mediator for regulating root system architecture in response to environmental cues. Plant Signal Behavior 9:1. <https://doi.org/10.4161/psb.27771>
- Ren B, Liang Y, Deng Y et al (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. <https://doi.org/10.1038/cr.2009.88>
- Rong X, Sang Y, Wang L et al (2018) Type-B ARR1s control carpel regeneration through mediating *AGAMOUS* expression in Arabidopsis. Plant Cell Physiol 59:761–769. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcx187>
- Schmülling T (2002) New insights into the functions of cytokinins in plant development. J Plant Growth Regul 21:40–49.
- Schmülling T, Werner T, Riefler M et al (2003) Structure and function of cytokinin oxidase/dehydrogenase genes of maize, rice, *Arabidopsis* and other species. J Plant Res 116:241–52. <https://doi.org/10.1007/s10265-003-0096-4>
- Shimizu-Sato S, Tanaka M, Mori H (2009) Auxin-cytokinin interactions in the control of shoot branching. Plant Mol Biol 69:429. <https://doi.org/10.1007/s11103-008-9416-3>
- Todorova D, Vaseva-Gemisheva I, Petrov P et al (2006) Cytokinin oxidase/dehydrogenase (CKX) activity in wild and ethylene-insensitive mutant *eti5* type of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh plants and the effect of cytokinin N1-(2-chloro-4-pyridyl)-N2-phenylurea on enzymatic activity and leaf morphology. Acta Physiol Plant 28:613–617. <https://doi.org/10.1007/s11738-006-0057-3>
- van Voorthuizen MJ, Nisler J, Song J et al (2021) Targeting cytokinin homeostasis in rapid cycling *Brassica rapa* with plant growth regulators INCYDE and TD-K. Plants 10(39):1–16. <https://doi.org/10.3390/plants10010039>
- Vaseva I, Todorova D, Malbeck J et al (2008) Response of cytokinin pool and cytokinin oxidase/dehydrogenase activity to abscisic acid exhibits organ specificity in peas. Acta Physiol Plant 30:151–155. <https://doi.org/10.1007/s11738-007-0103-9>
- Vaseva-Gemisheva I, Lee D, Karanov E et al (2005) Response of *Pisum sativum* cytokinin oxidase/dehydrogenase expression and specific activity to drought stress and herbicide treatments. Plant Growth Regul 46:199–208. <https://doi.org/10.1007/s10725-005-0143-3>
- Wang X, Ding J, Lin S et al (2020) Evolution and roles of cytokinin genes in angiosperms 2: Do ancient CKXs play housekeeping roles while non-ancient CKXs play regulatory roles?. Hortic Res 7:29. <https://doi.org/10.1038/s41438-020-0246-z>
- Werner T, Motyka V, Laucou V et al (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 (11):2532–2550. <https://doi.org/10.1105/tpc.014928>
- Werner T, Motyka V, Strand M, Schmülling T (2001) Regulation of plant growth by cytokinin. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(18):10487–10492. <https://doi.org/10.1073/pnas.171304098>
- Werner T, Nehnevajova E, Kollmer I et al (2010) Root-specific reduction of cytokinin causes enhanced root growth, drought tolerance, and leaf mineral enrichment in *Arabidopsis* and tobacco. *Plant Cell* 22:3905–3920. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.072694>
- Ye C, Wu S, Kong F et al (2006) Identification and characterization of an isopentenyltransferase (IPT) gene in soybean (*Glycine max* L.). *Plant Sci* 170:542–550. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.10.008>
- Yeh SY, Chen HW, Ng CY et al (2015) Down-regulation of cytokinin oxidase 2 expression increases tiller number and improves rice yield. *Rice* 8:36. <https://doi.org/10.1186/s12284-015-0070-5>
- Zatloukal M, Gemrotová M, Doležal K et al (2008) Novel potent inhibitors of *A. thaliana* cytokinin oxidase/dehydrogenase. *Bioorg Med Chem* 16(20):9268–9275. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2008.09.008>
- Zubko E, Adams CJ, Machaekova I et al (2002) Activation tagging identifies a gene from *Petunia hybrida* responsible for the production of active cytokinins in plants. *Plant J* 29:797–808. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2002.01256.x>

Надійшла в редакцію 09.12.2023
Після доопрацювання 02.01.2024
Прийнята до друку 18.03.2024