

## 玉米 *ZmCKX1* 基因的克隆及功能分析

陈 瑾<sup>1,2</sup>, 曹言勇<sup>2</sup>, 邵 强<sup>1</sup>, 王利锋<sup>2</sup>,  
李晶晶<sup>2</sup>, 王 浩<sup>2</sup>, 李会勇<sup>2\*</sup>

(1. 河南师范大学 生命科学学院, 河南 新乡 453007;  
2. 河南省农业科学院 粮食作物研究所, 河南 郑州 450002)

**摘要:** 利用 RT-PCR 技术, 从玉米自交系郑 58 中克隆了编码细胞分裂素氧化酶 1 的基因 (*ZmCKX1*), 该基因阅读框全长为 1 608 bp, 编码 535 个氨基酸, 蛋白质分子量为 57 kD, 理论等电点 pI=5.22。该基因与 *TaCKX1*、*AtCKX* 在核苷酸水平上同源性分别为 69%、49%。通过实时荧光定量 PCR 的方法对该基因的表达模式进行了分析, 结果表明, 在玉米雌穗中随着授粉时间的延长, *ZmCKX1* 基因表达量逐渐升高, 并且 *ZmCKX1* 基因在郑单 958 及其亲本、安玉 5 号及其亲本雌穗中的表达量明显不同, 表现为超低显性表达模式。因此推断, *ZmCKX1* 基因可能是一个与杂种优势相关的基因。

**关键词:** 玉米; *ZmCKX1*; 基因克隆; 功能分析

中图分类号: S513 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2012)08-0015-06

### Cloning and Functional Analysis of *ZmCKX1* in *Zea mays* L.

CHEN Jin<sup>1,2</sup>, CAO Yan-yong<sup>2</sup>, SHAO Qiang<sup>1</sup>, WANG Li-feng<sup>2</sup>, LI Jing-jing<sup>2</sup>,  
WANG Hao<sup>2</sup>, LI Hui-yong<sup>2\*</sup>

(1. College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China;  
2. Cereal Crops Institute, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China)

**Abstract:** A full-length cDNA sequence of *ZmCKX1* (cytokinin oxidase/dehydrogenase 1) was cloned by RT-PCR method from maize inbred line Zheng 58. The open reading frame of *ZmCKX1* is 1 608 bp in length and encodes a predicted protein of 535 amino acids, with a molecular weight of 57 kD and pI of 5.22. The alignment analysis of cDNA sequence showed that *ZmCKX1* shared 69% and 49% identity with the *TaCKX1* and *AtCKX*, respectively. The levels of *ZmCKX1* transcript accumulation were measured by quantitative PCR. The result showed that the expression level of *ZmCKX1* was increasing gradually with the extension of pollination time in ears. The expression pattern of *ZmCKX1* was underdominance in maize elite hybrids Zhengdan 958 and Anyu 5. The result suggested that *ZmCKX1* might be a heterosis-associated gene.

**Key words:** maize; *ZmCKX1*; gene clone; functional analysis

细胞分裂素(cytokinin, CK)是植物生长过程中的一类重要激素, 它可以促进细胞的分裂和分化、叶片的延伸、种子的萌发、叶绿体的成熟<sup>[1-6]</sup>, 参与调控

顶端优势、根区增生、营养信号的传递、分生组织的功能维持<sup>[7-11]</sup>和植株对环境的应激反应<sup>[12-13]</sup>等代谢过程。细胞分裂素氧化酶(cytokinin oxidase, CKX)

收稿日期: 2012-03-05

基金项目: 国家转基因生物新品种培育重大专项(2011ZX08003-004; 2009ZX08009-061B)

作者简介: 陈 瑾(1988-), 女, 河南开封人, 在读硕士研究生, 研究方向: 玉米种质资源和遗传育种。E-mail: mylovechenjin@163.com

\* 通讯作者: 李会勇(1977-), 男, 山西高平人, 副研究员, 博士, 主要从事玉米种质资源和功能基因组学研究。

E-mail: lihuiyong1977@126.com

通过移除细胞分裂素的 N<sup>6</sup>-异戊二烯链,不可逆地降解细胞分裂素,从而调控植物的生长发育<sup>[14-15]</sup>。

有研究表明,CKX 基因通过控制细胞分裂素水平调控植物体内依赖于细胞分裂素的生理进程。如 *AtCKX1* 基因在烟草中过表达改变了根和幼苗的生长发育,使烟草内源性 CKs 含量下降、幼苗发育迟缓、顶端分生组织变小,但根区分生组织发达,侧芽生长加快而使顶端优势受到抑制<sup>[4]</sup>; *AtCKX3* 基因在拟南芥中过表达导致 CKs 水平明显降低,花分生组织中原基形成的速率降低,进而使拟南芥的花朵数减少<sup>[8]</sup>。 *HvCKX2* 能够编码有功能的 CKX, *HvCKX2* 的异源表达改变了宿主植株的表型<sup>[5]</sup>。 *HvCKX1* 基因的沉默表达降低了大麦中 CKX 水平,并且提高了大麦产量<sup>[16]</sup>。 *OsCKX2* 过表达在水稻中引起了谷粒数的下降,而携带 *OsCKX2* RNA 干扰载体的转基因植株谷粒数和产量明显增加<sup>[6]</sup>。玉米细胞分裂素氧化酶 1 基因 (*ZmCKX1*) 是玉米中 13 个 CKX 基因之一<sup>[17]</sup>,其与水稻 *OsCKX2* 有 64% 的相似性, *ZmCKX1* 基因编码有功能的 CKX,定位在质外体<sup>[18]</sup>。但是 *ZmCKX1* 基因的功能还不清楚。

本研究通过同源克隆的方法,在玉米自交系郑 58 中克隆了 *ZmCKX1* 基因的 cDNA 全长,并利用实时荧光定量 PCR 的方法对该基因在不同自交系及其杂交后代中的表达模式进行了分析,旨在进一步阐述该基因的功能及其在玉米育种中的应用价值。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

供试材料为玉米自交系郑 58、昌 7-2、掖 478 及其杂交后代郑单 958、安玉 5 号,由河南省农业科学院粮食作物研究所提供。于 6 月中旬播种于河南省农科院试验基地,8 月下旬分别取未授粉的雌穗、雄穗以及授粉后 10 d、20 d、30 d 的雌穗。取样后立即经液氮冷冻, -80 °C 保存,备用。

### 1.2 总 RNA 的提取及纯化

取 -80 °C 保存的样品 100 mg 在液氮中快速研磨,使用柱式植物 RNA-out<sup>®</sup> 试剂盒(天恩泽基因公司,北京)进行样品 RNA 的提取及纯化,操作过程按照试剂盒说明书进行。最终洗脱 50 μL,取 2 μL RNA 样品进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。用分光光度计(日本岛津 UV-2550)检

测总 RNA 的浓度和纯度, OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 的比值在 1.8~2.0。检测合格的 RNA 于 -80 °C 保存,用于后续的试验操作。

### 1.3 cDNA 的合成

采用 TOYOBO 公司生产的 ReverTra ACE-α<sup>TM</sup> 反转录试剂盒反转录合成 cDNA。cDNA 合成反应体系为 20 μL: 总 RNA 1 μg, Oligo d(T) 引物 (25 pmol/μL) 1 μL, RNase Free H<sub>2</sub>O 7 μL, 混匀后 65 °C 反应 5 min, 然后迅速置于冰上冷却, 再加入 dNTP mix (10 mmol/L) 2 μL, RNase 抑制剂 (10 U/μL) 1 μL, ReverTra Ace 反转录酶 1 μL。混匀, 30 °C 反应 10 min, 42 °C 反应 1 h, 99 °C 反应 5 min 后终止反应。反转录产物应立即进行 PCR 或于 -20 °C 保存。

### 1.4 *ZmCKX1* 基因的克隆及分析

根据 GenBank 数据库中 *OsCKX2* (登录号: AB201593.1) 的氨基酸序列, 在 NCBI 上进行 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) 分析, 获得在玉米中与其同源的 cDNA 序列, 命名为 *ZmCKX1*, 设计全长扩增引物 *ZmCKX1* HindF (5'-TATAAGCTTATG-GCGGTGGTTTATTACCTG-3') 和 *ZmCKX1* SalR (5'-GTAGTCGACTCAGTTGAAGATGTCCTGGG-3')。以郑 58 雌穗授粉 30 d 后的反转录产物为模板, 利用 TaKaRa LA Taq<sup>®</sup> DNA 聚合酶(含 GC Buffer) 进行 RT-PCR。反应体系为 50 μL, 包含 2.5 U LA Taq 酶, 100 ng 模板 DNA, 25 μL 2× GC buffer I (含 MgCl<sub>2</sub>), 8 μL 2.5 mmol/L dNTP, 正向引物 (20 μmol/L) 和反向引物 (20 μmol/L) 各 1 μL。反应程序为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 62 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min, 40 个循环后 72 °C 再延伸 10 min。

PCR 扩增产物用普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(北京天根公司)进行回收, 回收产物与 pGEM<sup>®</sup>-T Easy 载体(Promega 公司, 日本)连接, 连接产物转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞, 经蓝白斑筛选及菌液 PCR 鉴定为阳性的克隆, 送南京金斯瑞生物公司进行序列测定。

### 1.5 *ZmCKX1* 基因序列分析和系统发育分析

利用在线工具 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 分析所获目的基因 cDNA 序列编码蛋白质的功能结构域。采用 DNAMAN 5.2.2 软件工具(Lynnon Biosoft Inc., 加拿大)推导 *ZmCKX1* 的氨

氨基酸序列,计算分子量及等电点;并利用 NCBI 的在线软件 BLAST 程序对目的基因进行同源比对,利用 DNAMAN 5.2.2 软件进行系统发育分析。

### 1.6 荧光定量 PCR

采用 Primer Premier 6.0 (Premier Biosoft Inc., 加拿大) 和 Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) 设计荧光定量 PCR 引物。目的基因 *ZmCKX1* 引物序列为 *ZmCKX1* qF: 5'-TGGAGATGAAGAA-CAAGTACGACC-3', *ZmCKX1* qR: 5'-ATGACCTTGACATACATCAGTGCAG-3'。以 *βtubulin* 基因为内参,引物序列为 *ZmTUB* qF: 5'-GCTATCCTGTGATCTGCCCTGA-3', *ZmTUB* qR: 5'-CGC-CAAACCTTAATAACCCAGTA-3'。引物由生工生物工程有限公司合成。分别以郑 58、昌 7-2、掖 478 及其杂交后代(郑单 958、安玉 5 号)共 5 个材料的雄穗(0 d)、雌穗(0 d、10 d、20 d、30 d)所提取的 RNA 反转录得到的 cDNA 为模板,使用试剂盒 THUNDERBIRD® SYBR® qPCR MIX (TOYOBO) 进行荧光定量 PCR,反应体系为 20 μL,内含 10 μL SYBR qPCR MIX, 0.3 μmol/L 正向引物和反向引物,1 μL cDNA 模板。反应程序为:95 °C 预变性 10 min; 95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 20 s, 40 个循环,反应在 Mastercycler® ep gradient S 荧光定量 PCR 仪 (Eppendorf Inc., 美国) 上运行,每个样品 3 个重复。采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法进行定量分析。

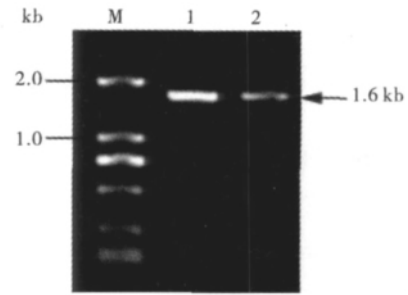
### 1.7 不同玉米自交系及其杂交后代的农艺性状调查

分别对玉米自交系郑 58、昌 7-2、掖 478 及其杂交后代的株高、穗位、叶片数、叶长、叶宽和穗粒数等主要农艺性状进行调查。随机选取 10 个植株,利用 Excel 2003 对数据进行处理。

## 2 结果与分析

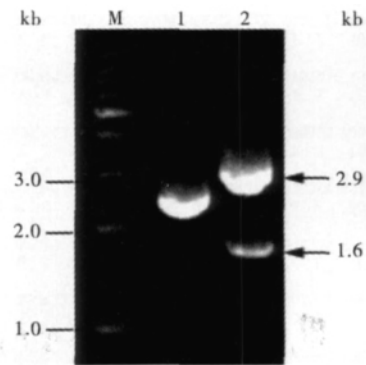
### 2.1 *ZmCKX1* 基因的克隆及其序列分析

以郑 58 雌穗授粉后 30 d 中提取的总 RNA 为模板, Oligo d(T) 引物反转录合成第一链 cDNA, 利用引物 *ZmCKX1* HindF 和 *ZmCKX1* SalR 进行 PCR 扩增, 电泳检测 PCR 产物, 得到预期大小的电泳条带(图 1)。将 PCR 产物回收后, 连接到 pGEM®-T Easy 载体上, 经过 *Hind* III/*Sal* I 双酶切鉴定(图 2), 对获得的阳性克隆 p*ZmCKX1* 进行测序。



M. 分子量标准 D2000; 1-2. PCR 产物

图 1 *ZmCKX1* 基因 cDNA PCR 扩增结果



M. 分子量标准 1 kb DNA ladder; 1. p*ZmCKX1* 质粒; 2. *ZmCKX1* 质粒 *Hind* III/*Sal* I 双酶切产物

图 2 p*ZmCKX1* 质粒 *Hind* III/*Sal* I 双酶切鉴定

对获得的郑 58 *ZmCKX1* cDNA 序列进行生物信息学分析, 结果表明: 该基因阅读框全长为 1 608 bp, 编码 535 个氨基酸(图 3), 蛋白质分子量为 57 kD, 理论等电点  $pI=5.22$ 。通过对 *ZmCKX1* 编码的氨基酸序列进行结构和功能位点分析 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 预测发现: 在 *ZmCKX1* 蛋白 1-18 位含有一个 18 个氨基酸长度的信号肽序列(MAVVYYLLLAGLIACSHA), 第 69-215 位和第 247-534 位分别是 CKX 基因家族的保守域: 黄素腺嘌呤二核苷酸结合域(FAD-binding domain)和细胞分裂素结合域(cytokinin-binding domain)。

### 2.2 *ZmCKX1* 基因的系统发育分析

利用 DNAMAN 5.2.2 软件构建玉米 *ZmCKX1* 与其他物种同源 cDNA 序列的系统发育树(图 4)。从图 4 可以看出, 玉米同高粱、大麦、小麦、水稻聚为一类, 该类均是单子叶植物禾本科, 其中大麦和小麦聚为一簇, 其中 *HvCKX1* (No. AK373850) 与小麦 *TaCKX2.1* (No. FJ648070) 同源性高达 91%, 说明其同源进化关系最近。 *AtCKX1* (No. NM129714) 同 *AtCKX3* (No. NM125079) 聚为一类, 两者同源性为 52%。玉米 *ZmCKX1* 同小麦 *TaCKX1* (No. DQ784573)、拟南芥 *AtCKX* 在核苷酸水平上同源性分别为 69%、49%。

```

1 ATGGCGGTGGTTTATTACCTGCTGCTGGCCGGGCTGATCGCTGCTCTCATGCACTAGCGGCGAGCCAGCCCTGGCTGGAGACGATCGCGCCCTCCCTGGCCAGCCCTCCCTGCCGG
1 M A V V Y Y L L L A G L I A C S H A L A A G T P A L G D D R G R P V P A S L A A
121 CTGGCCCTGGAGGGCAAGCTCCGGACCGACAGCAACGGCGGGCGGGCTCGACGGACTTCGGCAACATCACGTGGCGCTCCGGCGGGCTCTGTAACCATGCTCCACGGCGAC
41 L A L D G K L R T D S N A T A A A S T D F G N I T S A L P A A V L Y P S S T G D
241 CTGGTGGCGTCTGAGCGGGCAACTCCACCCCGGGGTGGCCCTACACCATCGGCTTCGGCGGGCGGGCCACTCCCTCATGGCCAGGGCTTCGCCCCCGGGCGCTGCTGTCAC
81 L V A L L S A A H S T P G W P Y T I A F R G R G H S L H G Q A F A P G G V V V H
361 ATGGCTCCCTGGGCGACCCACCGCCGGCGGGCGGCTAACGTGTCGGCGGACGGCGCTACGTGGACGGCGGGCGGAGAGGTTGGAATCGACGTGCTGCGCGCTGCTGGCG
121 M A S L G D A T A A P P R V H V S A D G R Y V D A G G E Q V W I D V L R A S L A
481 CGCGGCTGGCGGGCTCTGGACCGACTACCTTACCTACCGTGGCGGCGAGCTGTCACCGAGGCAATAGCGGCGAGGCGTTCGCCACGGCCACAGATATCTAACGTGCTG
161 R G V A P R S W T D Y L Y L T V G G T L S H A G I S G Q A F R H G P Q I S H V L
601 GAGATGGACCTTATCCCGCCATGGGAGATGGTGACGTGCTCCAGCAGCTGAGACGGGACCTGTTCCAGCGCTTCGGCGGGCTGGGGAGTTGGAGTGATCCCGGGCGGG
201 E H D V I T G H G E H V T C S K Q L N A D L F D A V I G G L G Q F G V I T R A R
721 ATCGCGTGGAGCGCGCGGGCGGGCGGGTGGGTGGCTGCTGTAACCGACTTCGGCGGCTTACGCGCGACAGGAGCGGCTGACCGCCCGGGCGGGCGGGCGGG
241 I A V E P A P A R A R W V R L V Y T D F A A F S A D Q E R L T A P R P G G G G A
841 TCGTTCGGCCGATGAGTACGTGGAGGGTGGTGTTCGTAACAGAGCTGGCGACCGACTGGCGAACCGGGGTTCTTACCGACCGGAGCTGCCCGGATGCTCGCGCTGCC
281 S F G P H S Y V E G S V F V H Q S L A T D L A N T G F F T D A D V A R I V A L A
961 GGGAGCGGAACCCACCCGCTGTAAGCATCGGGCCAGCTCAACTACGACACCGCCAGCGGGCGGGCGGGCGGGTGGACAGGAGCTCGCTCCGCTGGCCAGCGTGAAGTAC
321 G E R H A T T V Y S I E A T L H Y D H A T A A A A A V D Q E L A S V L G T L S Y
1081 GTGGAGGGTTCGCTTCCAGCGGACCTGGCTTACCGCGGCTTCTTTCAGCGGGTGTACGGCGAGGAGGTGGCGCTAACAGCTGGGGCTGTTGGGGTGGCCGACCCCGTGGCTAAC
361 V E G F A F Q R D V A Y A A F I D R V Y G E E V A L H K L G L W R V P H P W L N
1201 ATGTTCTGGCGGCTGGCGATCGCGACTTCGACCGGGCGGTTTCAGGGCATCTGACGGGACCGGACATCGTGGCGGGCTATCGCTACCCCTCAACAAATCCATGTTGGAC
401 H F V P R S R I A D F D R G V F E G I L Q G T D I V G P L I V Y P L N K S H W D
1321 GACGGCATGTCGGCGGCGACCGCTGAGGAGCTGTTCTACCGGGTGTCTGCTGCTTCTGCTGGTGGCGCCAGCGACTGGCGAGGCTGAGGAGCAGAACAGGAGATCTCGCG
441 D G H S A A T P S E D V F Y A V S L L F S S V A P N D L A R L Q E Q H R R I L R
1441 TCTCGGACCTCGCGGGATCCAGTACAGACCTCTGGCGGGCACAGGACCGAGTGGTCCGCCACTTCGGCGGGCAAGTGGAAATCGCTGTTGGAGATGAAAGAACAG
481 F C D L A G I Q Y K T Y L A R H T D R S D W V R H F G A A K W H R L V E H K H X
1561 TACGACCCCAAGAGGCTGCTCTCCCGGGCGAGGACATCTCAACTGA
521 Y D P K R L L S P G Q D I F H *

```

图 3 玉米 *ZmCKX1* 基因 cDNA 和氨基酸序列

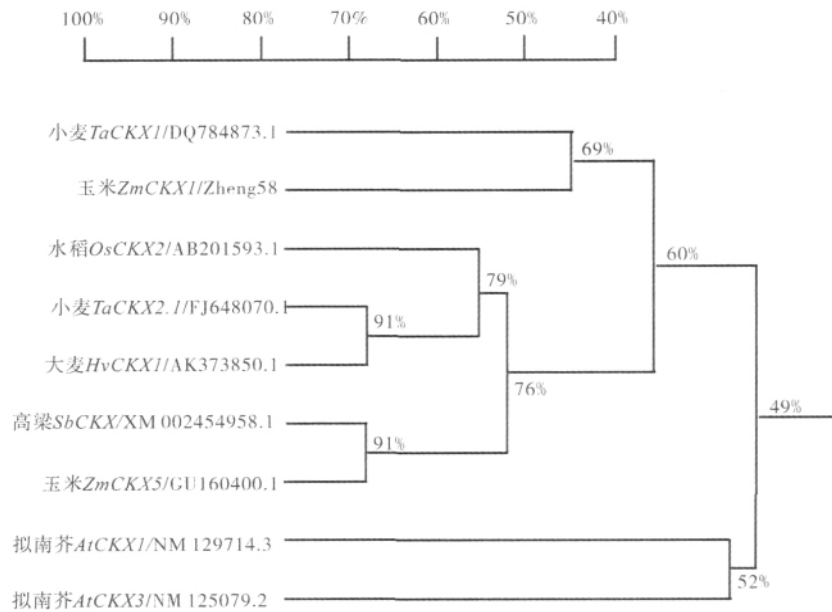
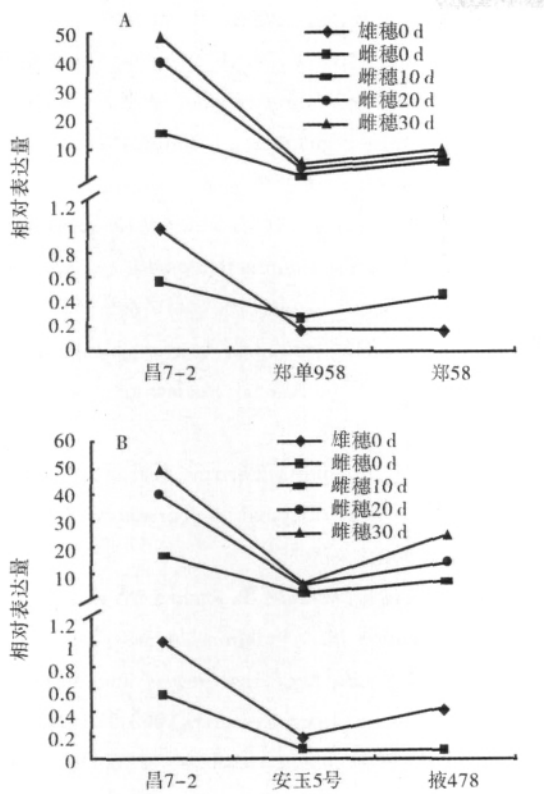


图 4 *ZmCKX1* 与其他物种同源 cDNA 序列系统发育树

### 2.3 *ZmCKX1* 在不同自交系及杂交后代的表达模式分析

应用实时荧光定量 PCR 的方法检测 *ZmCKX1* 基因在不同玉米自交系及其杂交后代的表达模式, 结果表明, *ZmCKX1* 基因在雄穗的表达量较低, 在雌穗中随着授粉时间的延长, *ZmCKX1* 基因的表达量有逐渐升高的趋势; 并且 *ZmCKX1* 基因的表达量在玉米自交系郑 58、昌 7-2、掖 478 及其杂交后代

中明显不同, 在杂交后代中 *ZmCKX1* 基因相对于亲本自交系表现为明显的超低显性(图 5)。 *ZmCKX1* 基因在杂交后代的雌穗发育过程中的低显性表达, 有利于细胞分裂素的合成与积累, 能够促进细胞的分裂和分化以及叶片的延伸、延缓叶片衰老、调节营养信号的传递、维持分生组织功能, 最终使产量增加<sup>[1-2,8]</sup>。因此, 推断该基因是一个与杂种优势相关的基因。



以昌-2 雄穗 0 d 的 *ZmCKX1* 表达量为 1  
 图 5 *ZmCKX1* 基因在郑 58、昌 7-2、掖 478 及其杂交后代郑单 958、安玉 5 号不同组织中的相对表达量

2.4 不同玉米自交系及其杂交后代的农艺性状分析

由图 6 可以看出, 2 个杂交组合相对其亲本自交系来讲, 叶宽、叶片数、株高、穗位、叶长和穗粒数都表现出了较强的杂种优势, 在杂交后代中表现为叶片变宽、叶片数增加、株高和穗位升高、穗粒数增加等。

3 结论与讨论

本研究通过 RT-PCR 的方法从玉米自交系郑 58 中克隆了 *ZmCKX1* 基因的 cDNA 全长 (1 608 bp), 它编码 535 个氨基酸, 蛋白质分子量为 57 kD, 理论等电点 pI=5. 2, 序列分析表明, *ZmCKX1* 编码的蛋白含有一个 FAD-binding 结构域和 FAD/cyto-kinin-binding 结构域。

通过实时荧光定量 PCR 分析表明, 随着授粉时间的延长, *ZmCKX1* 基因在雌穗的表达量逐渐升高, 并且在杂交后代中 *ZmCKX1* 相对于亲本自交系来讲表现为超低显性的表达模式, 而杂交后代叶宽、叶片数、株高、穗位、叶长和穗粒数等相对于自交系均显示出较强的杂种优势, 因此, *ZmCKX1* 基因在杂种优势形成过程中可能存在复杂的分子调控机

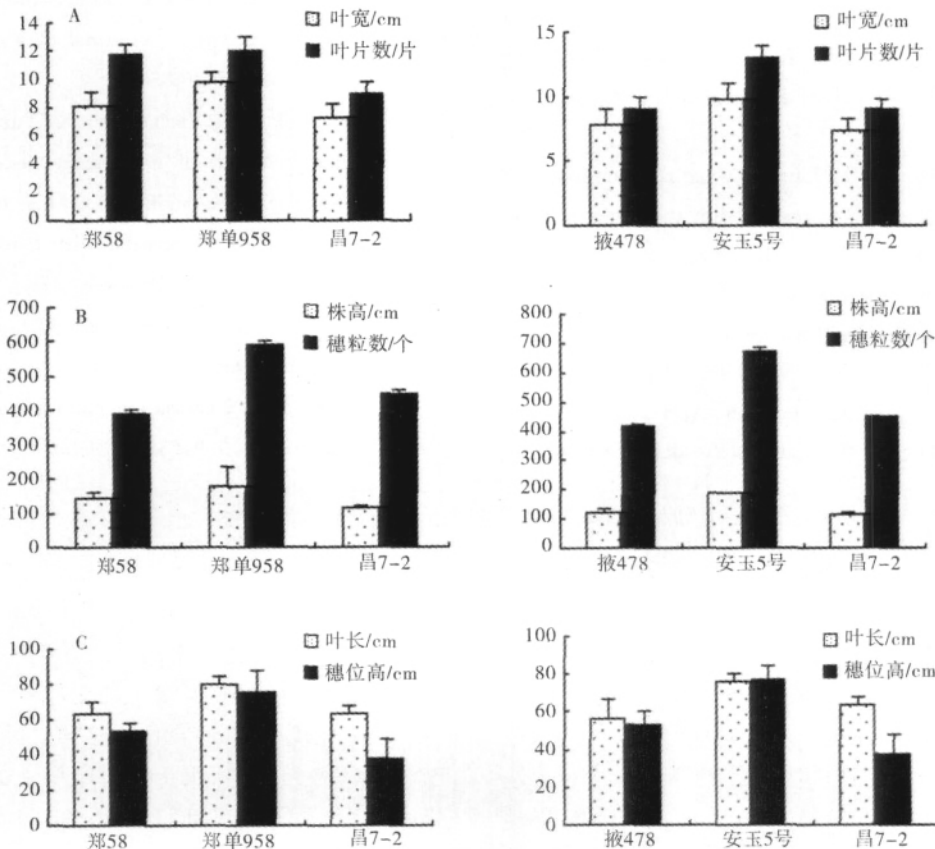


图 6 郑 58、昌 7-2、掖 478 及其杂交后代郑单 958 和安玉 5 号的主要农艺性状

制,同时 *ZmCKX1* 基因通过调控细胞分裂素的水平,有利于杂种优势的形成。

参考文献:

- [1] Mok D W S, Mok M C. Cytokinin metabolism and action[J]. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 2001, 52: 89-118.
- [2] Sachs T, Thimann KV. The role of auxin and cytokinins in the release of buds from dominance[J]. American Journal of Botany, 1967, 54: 134-144.
- [3] Tanaka M, Takei K, Kojima M, et al. Auxin controls local cytokinin biosynthesis in the nodal stem in apical dominance[J]. The Plant Journal, 2006, 45: 1028-1036.
- [4] Werner T, Motyka V, Strnad M, et al. Regulation of plant growth by cytokinin[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2001, 98: 10487-10492.
- [5] Galuszka P, Frebortova J, Werner T, et al. Cytokinin oxidase/dehydrogenase genes in barley and wheat cloning and heterologous expression[J]. European Journal of Biochemistry, 2004, 271: 3990-4002.
- [6] Ashikari M, Sakakibara H, Lin S, et al. Cytokinin oxidase regulates rice grain production[J]. Science, 2005, 309: 741-745.
- [7] Takei K, Takahashi T, Sugiyama T, et al. Multiple routes communicating nitrogen availability from roots to shoots: A signal transduction pathway mediated by cytokinin[J]. Journal of Experimental Botany, 2002, 53: 971-977.
- [8] Werner T, Motyka V, Laucou V, et al. Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alternations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity[J]. The Plant Cell, 2003, 15: 1-20.
- [9] Higuchi M, Pischke M S, Mahonen A P, et al. In planta functions of the *Arabidopsis* cytokinin receptor family [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 2004, 101: 8821-8826.
- [10] Leibfried A, To J P, Busch W, et al. Controls meristem functions by direct regulation of cytokinin-inducible response regulators[J]. Nature, 2005, 438: 1172-1175.
- [11] Kurakawa T, Ueda N, Maekawa M, et al. Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme[J]. Nature, 2007, 445: 652-655.
- [12] Sakakibara H. Cytokinins: Activity, biosynthesis, and translocation[J]. Annual Review of Plant Biology, 2006, 57: 431-449.
- [13] Werner T, Kollmer I, Bartrina I, et al. New insights into the biology of cytokinin degradation[J]. Plant Biology, 2006, 8: 371-381.
- [14] Schmulling T, Werner T, Riefier M, et al. Structure and function of cytokinin oxidase/Dehydrogenase genes of maize, rice, *Arabidopsis* and other species [J]. Journal of Plant Research, 2003, 116: 241-252.
- [15] Galuszka P, Frebort I, Sebel M, et al. Degradation of cytokinins by cytokinin oxidases in plants[J]. Plant Growth Regulate, 2000, 32: 315-327.
- [16] Zalewski W, Galuszka P, Gasparis S, et al. Silencing of the *HvCKX1* gene decreases the cytokinin oxidase/dehydrogenase level in barley and leads to higher plant productivity[J]. Journal of Experimental Botany, 2010, 61: 1839-1851.
- [17] Vyroubalova S, Vaclavikova K, Tureckova V, et al. Characterization of new maize genes putatively involved in CK metabolism and their expression during osmotic stress in relation with cytokinin levels[J]. Plant Physiol, 2009, 151: 433-447.
- [18] Morris R O, Bilyeu K D, Laskey J G, et al. Isolation of a gene encoding a glycosylated cytokinin oxidase from maize[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1999, 255: 328-333.