

ROMUALD CZERPAK i ALICJA PIOTROWSKA

Zakład Biochemii Roślin

Instytut Biologii

Uniwersytet w Białymstoku

Świerkowa 20 B, 15-950 Białystok

e-mail: alicjap@uwb.edu.pl

CYTOKININY, ICH STRUKTURA, METABOLIZM I AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA

WSTĘP

Cytokininy, poza podstawowymi właściwościami stymulacji podziałów komórkowych i opóźniania procesów starzenia się, współuczestniczą z innymi fitohormonami w regulacji i koordynacji wielu procesów biochemiczno-fizjologicznych i morfogenetycznych podczas całej ontogenezy, a najintensywniej w młodych szybko rosnących roślinach. Pierwsza cytokinina tj. N^6 -furfuryloadenina (FA) zwana potocznie kinetyną została wyizolowana przez MILLERA i współprac. (1955a, b) z komórek zwierzęcych i drożdży jako artefakt powstały podczas preparatyki kwasów nukleinowych. Naturalną cytokininę po raz pierwszy wyizolował LETHAM w 1963 r. z niedojrzałych ziaren kukurydzy (*Zea mays*) i nazwał ją zeatyną. Jest to N^6 - (Δ^2 -4-hydroksyizopentenyl) adenina, która powszechnie występuje w świecie roślin i intensywnie stymuluje podziały komórkowe tkanki twórczej. W następnych latach, z roślin naczyniowych, glonów, bakterii i grzybów, wyodrębniono sporo związków o właściwościach cytokininowych, pochodnych adeniny, z podstawnikami alifatycznymi przy azocie grupy aminowej połączonej z atomem węgla C-6

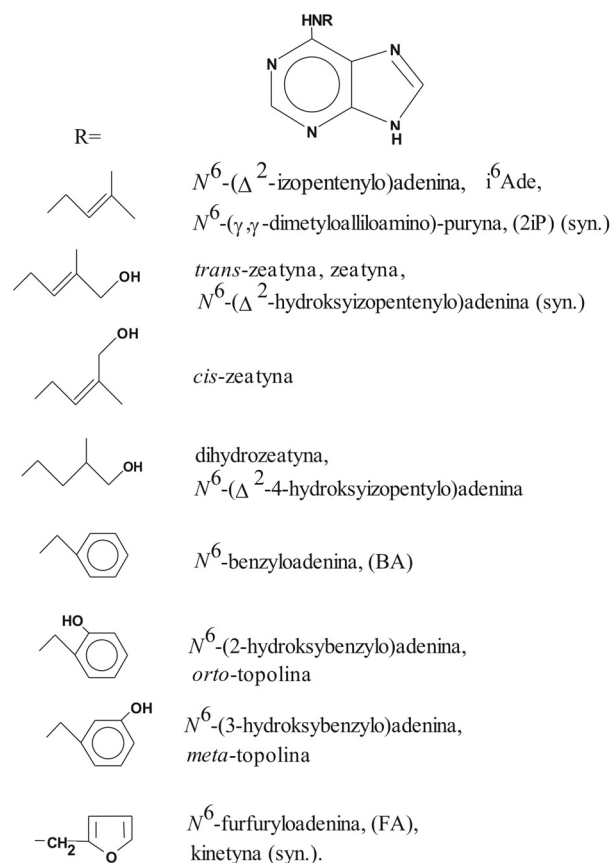
(LETHAM 1963, SKOOG i współaut. 1967, LEONARD i współaut. 1969, ROGOZIŃSKA 1969, SKOOG i ARMSTRONG 1970, VAN STADEN i BRECH 1973, AUGIER 1974, BORKOWSKA 1976, KENTZER i współaut. 1980, MILLER 1985). W przyrodzie najczęściej spotykane są cytokininy z alifatycznym podstawnikiem izopentenylowym w różnych modyfikacjach chemicznych, zaś rzadziej występują z rodnikiem benzylovym i jego hydroksylowymi pochodnymi (HORGAN i współaut. 1975, ERNST i współaut. 1983, STRNAD 1997, BAROJA-FEMANDEZ i współaut. 2002). Również aktywność cytokininową wykazują niektóre związki syntetyczne pochodne mocznika z podstawnikami: fenylovym, pirydylowym, tiadiazolowym i ich różnymi modyfikacjami chemicznymi. Tego rodzaju cytokininy próbuje się zastosować w praktyce rolniczo-ogrodniczej i sadowniczej (BRUCE i współaut. 1965; TAKAHASHI i współaut. 1978; IWAMURA i współaut. 1980; KUROSAKI i współaut. 1981; MOK i współaut. 1982, 1987, MOK i MOK 1985; THOMAS i KATTERMAN 1986; KLYACHKO i współaut. 1987; BORKOWSKA i LITWIŃCZUK 1993; HEUTTEMAN i PREECE 1993).

BUDOWA CHEMICZNA CYTOKININ POCHODNYCH ADENINY I MOCZNIKA

Naturalne cytokininy są pochodnymi zasady purynowej adeniny, w której do grupy aminowej zlokalizowanej przy atomie węgla C-6

przyłączony jest najczęściej pięciowęglowy izoprenowy łańcuch alifatyczny, a rzadziej aromatyczny podstawnik benzylovym, w różnych

modyfikacjach chemicznych (Ryc. 1). Również znane są syntetyczne analogi chemiczne cytokinin, np. N^6 -farnezyloadenina, N^6 -geranyloadenina, N^6 -cykloheksyloadenina i N^6 -furfuryloadenina, jako jedna z najbardziej aktywnych biologicznie (SKOOG i ARMSTRONG 1970, HORGAN i współaut. 1975, BORKOWSKA 1976, MILLER 1985, MOORE 1989, KAMINEK i współaut. 1992, MOK i MOK 2001).



Ryc. 1. Chemiczna struktura pospolitych wolnych form cytokinin pochodnych adeniny (MOK i MOK 2001).

W roślinach powszechnie występują cytokininy z podstawnikami alifatycznymi, głównie zeatyna, dihydrozeatyna, N^6 - Δ^2 -izopentyloadenina (2iP), 9- β -D-rybofurnazylo-2iP (IPA) i ich różne modyfikacje z dodatkowymi podstawnikami: hydroksylowym lub metylowym (BORKOWSKA 1976, MILLER 1985, NANDI i współaut. 1989, MCGAW i BURCH 1995). Natomiast rzadziej spotykane są cytokininy z aromatycznym podstawnikiem benzylovym: jak N^6 -benzyloadenina (BA) i jej hydroksylowe pochodne: N^6 -*orto*-hydroksybenzyloadenina i N^6 -*meta*-hydroksybenzyloadenina, zwane po-

tocznie *o*- i *m*-topolinami, gdyż po raz pierwszy zostały wykryte w topoli (*Populus robusta*) i nieco później w anyżku (*Pimpinella anisum* L.) (HORGAN i współaut. 1975, ERNST i współaut. 1983). Ostatnio coraz częściej potwierdza się ich obecność w innych grupach taksonomicznych roślin (STRNAD 1997, BAROJA-FEMANDEZ i współaut. 2002).

SKOOG ze współpracownikami (1967) jako pierwszy wykazał, że stymulująca aktywność cytokinin zależy przede wszystkim od charakteru chemicznego podstawnika w pozycji N^6 . W przypadku cytokinin z podstawnikiem alifatycznym, ich aktywność stymulująca uwarunkowana jest długością łańcucha, liczbą i rozmieszczeniem w nim wiązań podwójnych oraz dodatkowo przyłączoną grupą hydroksylową bądź metylową. Spośród takich cytokinin największą aktywność wykazują te, które mają przyłączony pięciowęglowy łańcuch pochodny izoprenu z wiązaniem podwójnym w środku cząsteczki i przyłączoną do czwartego atomu węgla grupą hydroksylową. Takim związkiem jest zeatyna, która może tworzyć dwie formy izomeryczne: *cis* o mniejszej aktywności biologicznej i *trans* – o większej (LETHAM 1963, MATSUBARA 1980, MOORE 1989).

Okazało się, że wprowadzenie dodatkowych podstawników do cytokinin, np. do azotu grupy aminowej lub bezpośrednio do pierścienia purynowego, niekorzystnie wpływa na stymulujące działanie cytokinin na wzrost i procesy fizjologiczno-metaboliczne roślin. W przypadku cytokinin zawierających podstawnik aromatyczny, np. BA, bądź heterocykliczny jak FA, stwierdzono, że tylko jednowęglowy mostek alkilowy przy azocie N^6 grupy aminowej adeniny z w/w podstawnikami najkorzystniej wpływa na ich stymulującą aktywność biologiczną. Każda modyfikacja chemiczna polegająca na wprowadzeniu do grupy aminowej, a szczególnie do pierścienia zasady purynowej, dodatkowych podstawników, zwłaszcza takich jak: chlorowce, grupa sulfhydrylowa, azowa bądź aminowa, przeważnie powoduje wytworzenie u nich silnych właściwości antycytokininowych hamujących podziały komórkowe, ich wzrost i metabolizm. Niektóre z tego rodzaju antycytokinin działają mutagennie, gdyż mogą być wbudowywane do DNA genomu komórkowego (SKOOG i współaut. 1967, BORKOWSKA 1976, KUROSAKI i współaut. 1981).

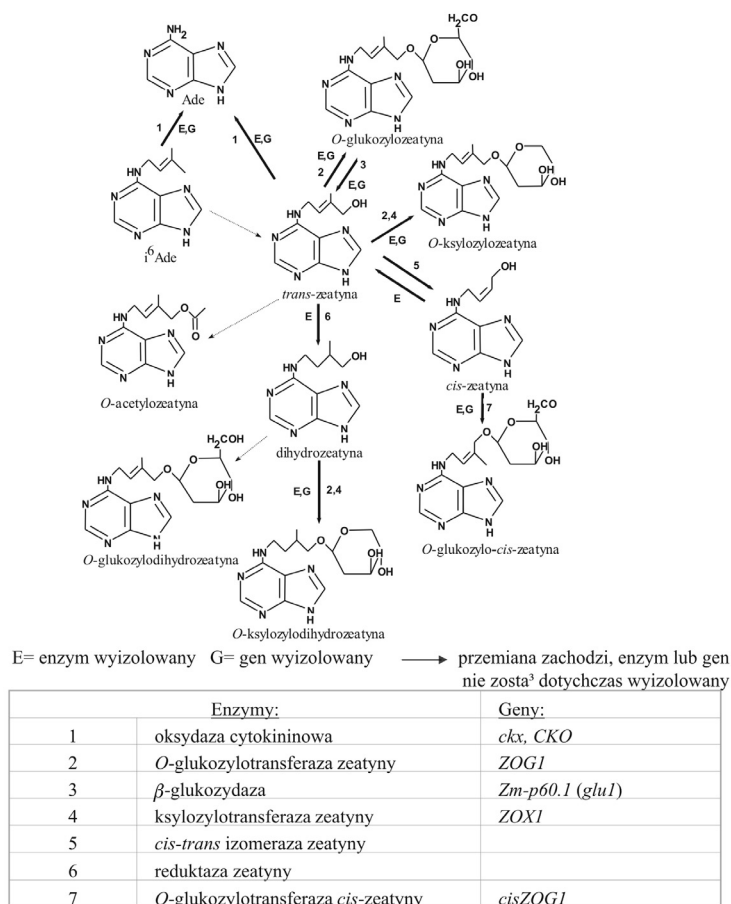
Cytokininy tworzą liczne połączenia *N*-glikozydowe przeważnie z azotem *N*-9, sporadycz-

R ₁	R ₂	R ₃	Nazwa zwyczajowa
	-	H	<i>N</i> ⁶ (Δ ² -izopentenylo) adenina (2iP)
	-	rybozyl	<i>N</i> ⁶ (Δ ² -izopentenylo) adenozyne (IPA-rybozyd)
	-	rybozyd	<i>N</i> ⁶ (Δ ² -izopentenylo) adenozyne-monofosforan
	glukozył	-	<i>N</i> ⁶ (Δ ² -izopentenylo) adenino-7-glukozyd
	-	H	<i>trans</i> -zeatyna
	-	rybozyl	<i>t</i> -zeatyny rybozyd
	-	glukozył	<i>t</i> -zeatyny-9-glukozyd
	glukozył	-	<i>t</i> -zeatyny-7-glukozyd
	-	alanyl	lupinowy kwas
	-	rybozyd	rybozyd-5-monofosforan- <i>t</i> -zeatyny
	-	H	zeatyny- <i>O</i> -glukozyd
	-	rybozyl	<i>O</i> -glukozyd rybozydu zeatyny
	-	H	dihydrozeatyna
	-	rybozyl	dihydrozeatyny rybozyd
	-	glukozył	dihydrozeatyny-9-glukozyd
	glukozył	-	dihydrozeatyny-7-glukozyd
	-	alanyl	dihydrolupinowy kwas
	-	rybozyd	rybozyd-5'-monofosforanu dihydrozeatyny
	-	H	dihydrozeatyny- <i>O</i> -glukozyd
	-	rybozyl	<i>O</i> -glukozyd rybozydu dihydrozeatyny
	-	H	<i>N</i> ⁶ (benzyl) adenina
	-	rybozyl	<i>N</i> ⁶ (benzyl) adenozyne
	-	glukozył	9-glukozyd- <i>N</i> ⁶ (benzyl) adeniny
	glukozył	-	7-glukozyd- <i>N</i> ⁶ (benzyl) adeniny

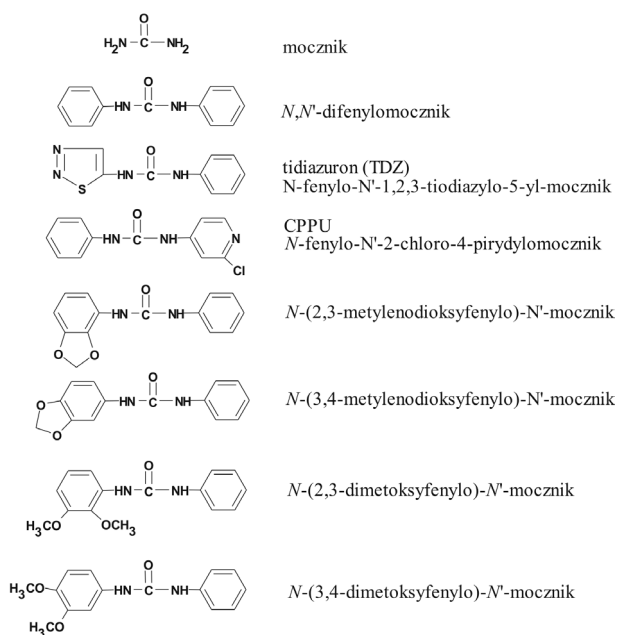
Ryc. 2. Struktura i nazewnictwo połączeń glikozydowych naturalnych cytokinin pochodnych adeniny, zawierających grupy cukrowe: β-D-glukopiranozyłową i β-D-rybofuranozyłową (BORZOBHATY i współpracownicy 1994).

nie *N*-7, najczęściej z rybozą bądź glukozą a rzadziej z ksylozą (Ryc. 2). Rzadziej spotykane są połączenia cytokinin *O*-glikozydowe z glukozą bądź ksylozą oraz estrowe kwasu fosforowego lub octowego z grupą hydroksylową łańcucha alifatycznego zlokalizowanego przy azocie *N*⁶ grupy aminowej zeatyny i dihydrozeatyny (Ryc. 2, 3). Wśród niektórych roślin np. w młodych łodygach i korzeniach łubinów (*Lupinus sp.*), korzeniach kiełkujących nasion fasoli (*Phaseolus sp.*) i niedojrzałych nasionach jabłoni (*Malus sp.*) wykryto amidowe połączenie aminokwasu alaniny z azotem *N*-9 cytokiny. Połączenie to zostało nazwane kwasem lupinowym, który nie wykazuje już stymulującej aktywności (LETHAM 1963, MATSUBARA 1980, MCGAW i BURCH 1995).

Odrębną grupę związków o właściwościach cytokininowych stanowią pochodne mocznika z podstawnikami fenyłowymi, bądź nienasyconymi heterocyklicznymi, np. pirydylowym, tiodiazolowym i ich modyfikacjami z przyłączoną dodatkowo grupą: hydroksylową, chlorkową, metylową, metoksyłową, metylenodioksyłową, itp. (Ryc. 4). W latach 60. BRUCE ze współpracownikami (1965) jako pierwsi wykazali stymulujące działanie *N,N'*-difenylomocznika, a następnie przebadali kilkaset pochodnych mocznika określając ich aktywność biologiczną. Aktualnie najczęściej stosowanych jest kilkanaście cytokinin mocznikowych, spośród których szczególne znaczenie, poza difenylomocznikiem (DPU), mają tidiazuron (TDZ), *N*-fenyl-*N'*-2-chloro-



Ryc. 3. Enzymy i geny uczestniczące w modyfikacjach N^6 -izoprenoidowego łańcucha cytokinin adeninowych (MOK i MOK 2001).



4-pirydyłomocznik (CPPU), N -2,3- lub N -3,4-dimetoksyfenylo- N' -fenyłomocznik i N -2,3- lub N -3,4-metylenodioksyfenylo- N' -fenyłomocznik (Ryc. 4) (TAKAHASHI i współaut. 1978; IWAMURA i współaut. 1980; MOK i współaut. 1982; 1987; MOK i MOK 1985; THOMAS i KATTERMAN 1986; MOK i MOK 2001; RICCI i współaut. 2001). Właściwości cytokininopodobne wykazują także niektóre związki o różnej strukturze chemicznej, np. alantoina (5-ureidohydantoina), nitroguanidyna, kwas traumatynowy (1-deceno-1,10-dikarboksylowy) i inne (CZERPAK 1979, MOORE 1989, KAMINEK i współaut. 1992, CZERPAK i BAJGUZ 1997, JANKIEWICZ 1997).

Badania BRUCE i współaut. (1965) oraz KUROSAKI i współaut. (1981) wykazały, że cytokiny purynowe pochodne adeniny i cytokiny mocznikowe mają w cząsteczce taką samą

Ryc. 4. Chemiczna struktura bardziej znanych syntetycznych cytokinin pochodnych mocznika (MOK i MOK 2001, RICCI i współaut. 2001).

domenę warunkującą ich aktywność biologiczną. W przypadku cytokinin mocznikowych jest to fragment cząsteczki -HN-CO-NH-, zaś w cytokininach purynowych fragment pierścienia adeninowego -N=CH-NH-, odpowiadający pozycjom 7, 8, 9.

Cytokininy adeninowe w komórkach mogą występować w formie wolnych zasad oraz w połączeniach *N*-glikozydowych, najczęściej β -D-rybozy, rzadziej β -D-glukozy i sporadycznie β -D-ksylozy z azotem w pozycji *N*-9 lub *N*-7. Przeważnie łącząc się z rybozą, tworzą rybozyd, a po przyłączeniu do niego kwasu *ortho*-fosforowego przekształcają się w mononukle-

otyd zwany rybotydem. Obecność takich nukleotydów stwierdzono w sąsiedztwie antykodonu i pętli bocznej tRNA, fragmencie poliadenylowym mRNA, a nawet w rRNA, gdzie spełniają one istotną rolę regulacyjną o charakterze stymulującym w procesie translacji. Najaktywniejsze biologicznie są cytokininy w formie wolnych zasad i połączeń rybozydowych (MATSUBARA 1980, KUBOWICZ 1982, SPYCHAŁA i współaut. 1982, GWÓD i WOŃNY 1983, TEYSSENDER i współaut. 1984, NANDI i współaut. 1989, SUTY i współaut. 1993, BORZOBHATY i współaut. 1994, MCGAW i BURCH 1995, GAUDINO i PIKAARD 1997).

BIOSYNTETA I PRZEMIANY METABOLICZNE CYTOKININ ADENINOWYCH

Cytokininy są syntezowane w różnych rodzajach tkanki twórczej, ale głównym miejscem ich biosyntezy są merystemy wierzchołkowe systemu korzeniowego, tkanka kalusowa oraz młode intensywnie rosnące owoce i nasiona. W obrębie roślin cytokininy charakteryzują się słabą ruchliwością. Dotychczas biosynteza cytokinin nie jest w szczegółach całkowicie wyjaśniona. Według aktualnych poglądów istnieją dwa niezależne szlaki prowadzące do wytworzenia wolnych form cytokinin. Jeden z nich może polegać na uwalnianiu cytokin adeninowych w trakcie degradacji kwasów rybonukleinowych, głównie tRNA, który jest w nie najbogatszy. Ten szlak powstawania cytokinin nie ma wystarczających dowodów eksperymentalnych w pełni potwierdzających prawdziwość jego istnienia (LETHAM i PALNI 1983, NOODEN i LETHAM 1993, MCGAW i BURCH 1995, GRAY i współaut. 1996, CHEN 1997).

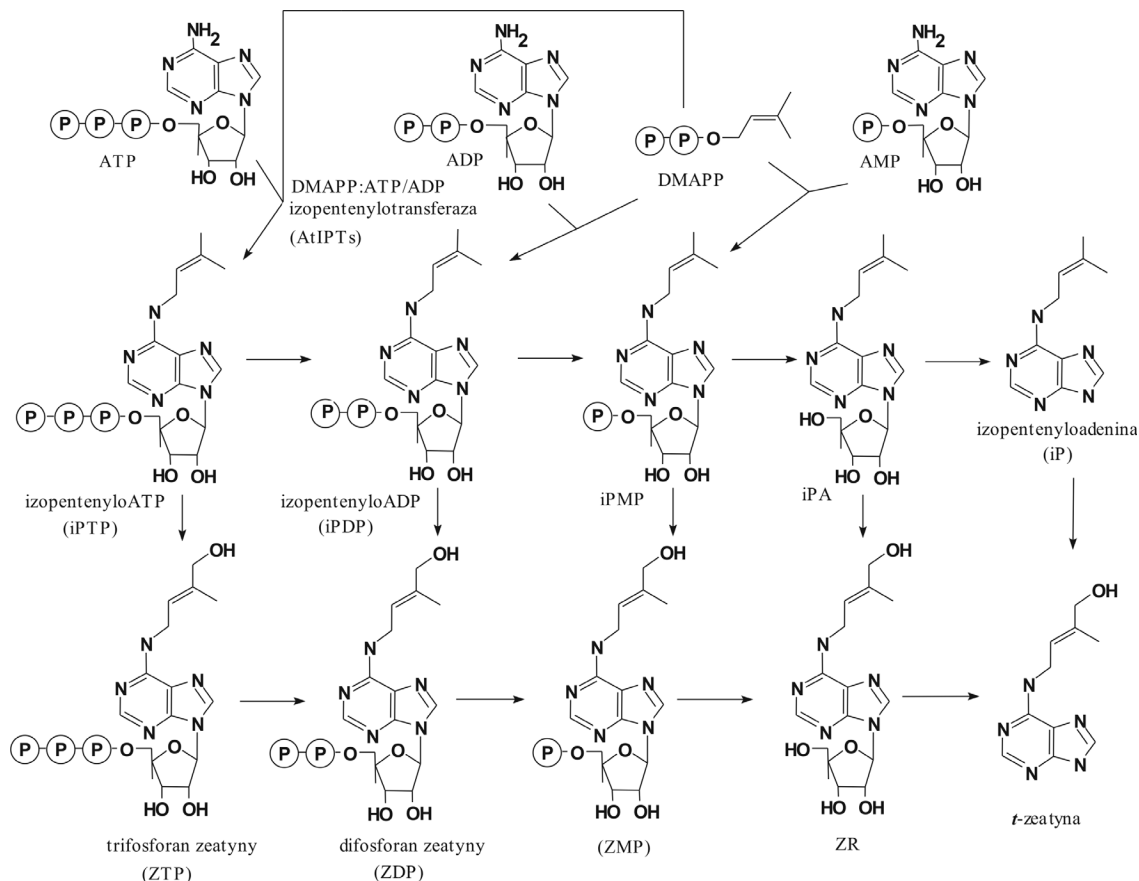
Również ostatnie badania BARCISZEWSKIEGO i współaut. (2000) sugerują, że istnieje duże prawdopodobieństwo wytwarzania kinetyny (*N*⁶-furfuryloaminopuryny) i być może innych cytokinin u roślin, bakterii symbiotycznych, a nawet w komórkach zwierzęcych z DNA, zwłaszcza w warunkach stresowych. Według tej hipotezy podczas oksydacyjnej degradacji nie tylko RNA, ale także DNA, poprzez reakcje hydrolizy i hydroksylacji mogą powstawać związki cytokininowe jako wtórne, nietoksyczne produkty reakcji, będące efektem neutralizacji szkodliwych grup w nukleotydach, budujących kwasy nukleinowe (AKIYOSHI i współaut. 1984, NIETO i FRANKENBERGER 1990, GRAY i współaut. 1996).

Cały szereg dotychczasowych doświadczeń wskazuje na to, że cytokininy syntezowane są przede wszystkim *de novo* z zasady purynowej adeniny i kwasu mewalonowego jako donora alifatycznego łańcucha bocznego przy azocie grupy aminowej *N*⁶. Biosynteza cytokinin *de novo*, których szlaki mogą być inicjowane przez przyłączenie łańcucha izopentenylowego, pochodzącego z aktywnego α,α -dimetyloallilo-pirofosforanu do azotu *N*⁶ grupy aminowej mononukleotydów adeninowych: AMP lub ADP bądź ATP, w reakcji katalizowanej przez enzym transferazę izopentenylową są przedstawione w szczegółach na Ryc. 5. W ten sposób powstaje między innymi rybotyd *N*⁶- Δ^2 -izopentenyl-AMP (rybotyd 2iP), który może ulegać wielu przemianom metabolicznym i modyfikacyjnym tworząc różne formy cytokinin, tj. rybotydy, rybozydy i wolne zasady głównie zeatynę, dihydrozeatynę, izopentenyladeninę (2iP) i *N*⁹-rybozyd 2iP (IPA) (CHEN i MELITZ 1979, AKIYOSHI i współaut. 1984, NIETO i FRANKENBERGER 1990, BLACKWELL i HORGAN 1994, MCGAW i BURCH 1995, KAKIMOTO 2001).

W cytoplazmie i wakuolach komórek roślinnych, cytokininy endo- i egzogenne, ulegają różnorodnym przemianom i modyfikacjom biochemicznym (Ryc. 6). W efekcie tych przemian najczęściej powstają formy nieaktywne biologicznie o funkcji transportowej, bądź zapasowej w celu zwiększenia ich puli, aby mogły być wykorzystane do regulacji w poszczególnych fazach wzrostu i rozwoju całych roślin i ich pojedynczych komórek. Dotychczas najlepiej zostały poznane przemiany metaboliczne dotyczące konwersji między

formami zasadowymi cytokinin, a ich połączeniami nukleotydowymi i nukleotydowymi (Ryc. 3) (NANDI i współaut. 1989, KAMINEK i współaut. 1992, VAN STADEN i DREWES 1992, BINNS 1994, CHEN 1997, JONES 1998, MOK i MOK 2001).

lacji z udziałem glukozy bądź ksylozy, a także estryfikacji z kwasem octowym lub *orto*-fosforowym (Ryc. 3, 6, 7). W przemianach metabolicznych cytokinin uczestniczą liczne enzymy jak: oksydazy, defosforylasy (fosfatasy), fosforylasy, reduktazy, *cis-trans*-izomerazy, glukozy-

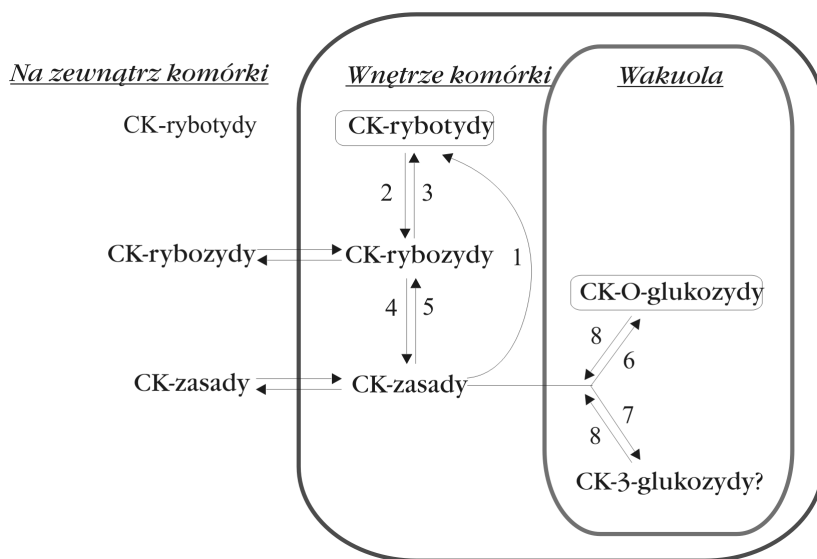


Ryc. 5. Model biosyntezy cytokinin, inicjowanej głównie przez przyłączenie izopentenyloвого łańcucha do AMP, ADP lub ATP (KAKIMOTO 2001).

Przemiany metaboliczne cytokinin dotyczą szkieletu purynowego cząsteczki, a także jej łańcucha alifatycznego, co w szczególności przedstawiają Ryc. 3, 5–7. Jednym z rodzajów przemian jest enzymatyczne przekształcenie rybotydów cytokininowych poprzez defosforylację w rybozydy, które po odłączeniu rybozy stają się wolnymi zasadami cytokininowymi. Poznana jest dobrze przemiana zeatyny, poprzez redukcję wiązania podwójnego w jej bocznym łańcuchu alifatycznym do dihydrozeatyny. Cytokiny adeninowe, najczęściej w pozycjach *N*-7 i *N*-9, a także cytokiny mocznikowe łącząc się przeważnie z rybozą bądź glukozą, a rzadziej z ksylozą łatwo ulegają *N*-glikozylacji. Również grupa hydroksylowa alifatycznego łańcucha bocznego form *cis*- i *trans*-zeatyny oraz dihydrozeatyny mogą ulegać *O*-glikozy-

lo- i ksylozylo-transferazy, β -glukozydazy, nukleozydazy, hydroksylazy i inne, wraz z grupą genów kodujących ich biosyntezę (Ryc. 3) (GUERN i PÉAND-LENOËL 1981, LETHAM i PALNI 1983, LETHAM i ZHANG 1989, GERHAUSER i BOPP 1990, KING i VAN STADEN 1990, NOODEN i LETHAM 1993, BORZOBHATY i współaut. 1994, CHEN 1997, MOK i współaut. 2000).

Nadmiar cytokinin w komórce ulega nieodwracalnej biodegradacji, którą zapoczątkowuje enzym oksydaza cytokininowa (Ryc. 7), powodująca odłączenie łańcucha alifatycznego w postaci 3-metylo-2-butenalu od pierścienia purynowego adeniny. Z kolei adenina może ulegać dalszym powszechnie znanym przemianom katabolicznym, aż do mocznika i dwutlenku węgla. Okazało się, że cytokiny z nasyconym łańcuchem alifatycznym – izopentenylo-



Ryc. 6. Metaboliczne przemiany i połączenia glikozydowe cytokinin w komórkach roślin; (1) fosforybozylotransferaza adeninowa, (2) 5'-nukleotydaza, (3) kinaza adeninowa, (4) nukleozydaza adenozynowa, (5) fosforylaza adeninowa, (6) O-glukozylotransferaza, (7) 7(?) -glukozylotransferaza, (8) β-glukozydaza (KAMINEK i współaut. 1992, 1997).

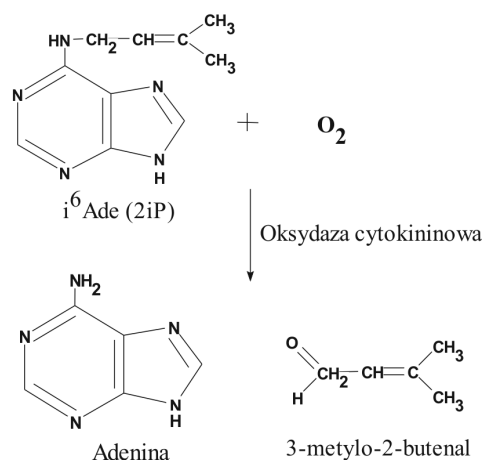
wym, jak dihydrozeatyna, oraz z podstawnikami aromatycznymi, np. benzylovym w BA i furylovym w FA, a także cytokiny mocznikowe są odporne na działanie oksydazy cytokininowej. Przypuszcza się, że cytokiny mocznikowe mogą ulegać degradacji pod wpływem

specyficznej ureazy powodującej ich rozpad do aromatycznych amin i dwutlenku węgla. (GERHAUSER i BOPP 1990, KING i VAN STADEN 1990, VAN STADEN i DREWES 1992, JONES 1998, RINALDI i COMANDINI 1999).

AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA CYTOKININ

Cytokiny, poza podstawowymi właściwościami stymulacji podziałów komórkowych nie tylko roślin naczyniowych, ale także glonów, bakterii i grzybów oraz opóźnianiem procesów ich starzenia się, wywierają duży wpływ aktywujący na wiele, różnorodnych procesów biochemiczno-fizjologicznych, przeważnie o charakterze anabolicznym. Głównie oddziałują na proces kariokinezy, zwłaszcza w stadium G2 interfazy. Przede wszystkim stymulują biosyntezę kwasów nukleinowych DNA i RNA, na różnych etapach ich tworzenia się podczas procesów replikacji i transkrypcji, aktywując enzymy polimerazy i transferazy. Niektóre cytokiny jako nukleotydy wbudowują się w sąsiedztwie antykodonu tRNA lub w jego pętli bocznej, a także we fragmencie poliadenylovym mRNA. Prawdopodobnie przyspieszają właściwe odczytywanie kodonów znajdujących się w mRNA przez komplementarne antykodony zlokalizowane w aminoacylotRNA, co ma istotne znaczenie w ich stymulacyjnej aktywności. Również stymulują proces translacji, zwłaszcza w fazie inicjacji i elongacji poprzez aktywację enzymów: syntazy aminoacylowej i aminoacylotransferaz oraz tworzenie się natywnej struktury białek, warun-

kującej ich aktywność biologiczną. Pod działaniem cytokinin z reguły wzrasta ilość i aktywność translacyjna rybosomów i polisomów, a także aktywność biochemiczna retikulum endoplazmatycznego. Efektem tych działań jest znaczny wzrost zawartości białek enzymatycznych, transportujących i regulujących procesy metaboliczne komórek. Cytokiny przede wszystkim osłabiają aktywność i



Ryc 7. Wstępny etap biodegradacji cytokinin adeninowych na przykładzie 2iP (RINALDI i COMANDINI 1999).

syntezę enzymów degradujących kwasy nukleinowe (zwłaszcza rybo- i deoksyrybonukleaz) oraz proteaz rozkładających białka, a także oksydaz, fosfataz i wielu innych. U roślin wpływ cytokinin na procesy metaboliczne kwasów nukleinowych i białek jest znacznie silniejszy niż auksyn i giberelin (NAJTO i współaut. 1978, GWÓD i WO NY 1983, SCHNEIDER i współaut. 1983, TEYSSENDER i współaut. 1984, MILLER 1985, SUTY i współaut. 1993, GAUDINO i PIKAARD 1997, FRANK i SCHMÜLLING 1999, RIOU-KHAMLIHI i współaut. 1999).

Generalnie cytokininy hamują procesy oksydacyjne, zwłaszcza aktywność oksydaz i oksygenaz, związanych z metabolizmem kwasów nukleinowych, białek, lipidów i węglowodanów. Prócz tego osłabiają końcowy etap utleniania komórkowego zachodzący w mitochondriach, powodując między innymi zmniejszenie zużycia tlenu (MILLER 1979, 1980; ROUSSAUX i współaut. 1986; KAMINEK i współaut. 1992).

Cytokininy przyspieszają transport aktywny metabolitów przez lipoproteinowe błony komórkowe, gdyż korzystnie oddziałują na ich chemiczną strukturę, powodując stymulację syntezy i zwiększenie zawartości w nich muko- i fosfolipidów, muko- i fosfoprotein, fitosteroli, amin i cyklotoli, a także zwiększenie proporcji kwasów tłuszczowych nienasyconych do nasyconych. Powoduje to zwiększenie się ilości mikropor i aktywności enzymów związanych z aktywnym transportem, a w rezultacie poprawia się przepuszczalność błon dla niezbędnych dla życia komórki metabolitów (MILLER 1979; 1980, 1985; KAMINEK i współaut. 1992; BRAULT i MALDINEY 1999; SHEEN 2002).

W rozwoju zarodkowym cytokininy pobudzają przekształcanie proplastydów w plastydy, głównie chloroplasty. Cytokininy oddziałują także stymulująco na intensywność procesu fotosyntezy poprzez aktywację wielu enzymów i metabolitów biorących udział w reakcjach składających się na fazę jasną i ciemną. Pod ich wpływem wzrasta aktywność enzymu karboksylazy/oksygenazy rybulozo-1,5-difosforanowej i innych enzymów katalizujących cykl Calvina, a także syntezę chlorofilu i karotenoidów, szczególnie karotenów i ksantofilu ubogich w tlen. Równocześnie stymulują tworzenie się kompleksów chlorofilowo-białkowych tzw. receptorów fotosyntetycznych, pochłaniających energię świetlną oraz proces foto-

syntetycznej fosforylacji, w wyniku której powstaje ATP (JENNINGS i współaut. 1972, NAJTO i współaut. 1978, VOLFOVA i współaut. 1979, DAVEY i VAN STADEN 1981, CANOVA 1982, WO NY 1984, TEYSSENDER i współaut. 1985, MOORE 1989, JELIČ i BOGDANOVIĆ 1990, KAMINEK i współaut. 1992, BINNS 1994, CZERPAK i BAJGUZ 1997, GENKOV i współaut. 1997).

W komórkach pod wpływem cytokinin nie tylko wzrasta ogólna pula metabolitów organicznych, ale również znacznie zwiększa się ilość składników mineralnych, wchodzących w skład struktur komórkowych, bądź uczestniczących w metabolizmie. Efektem tego działania jest między innymi zwiększenie biopotencjału błon komórkowych (SCHNEIDER i współaut. 1983, LEGOCKA i współaut. 1985, KAMINEK i współaut. 1992, MOK i MOK 2001).

Z kolei SAKAKIBARA i współaut. (1998) w badaniach na kukurydzy oraz TUN i współaut. (2001) w hodowli komórkowej rzodkiewnika, tytoniu i pietruszki, stosując duże stężenia rzędu 1mM BA i zeatyny wykazali, że cytokininy indukują szybki wzrost zawartości tlenu azotu (NO), aktualnie uważanego za wtórny przekaznik sygnałów komórkowych powstałych między innymi pod działaniem hormonów lub czynników stresowych.

Pod wpływem cytokinin następuje przyspieszenie procesów regeneracyjnych komórek oraz wydłużenie cyklu rozwojowego wielu roślin, zwłaszcza glonów, a także zwiększenie objętości komórek poprzez kumulację niektórych metabolitów i wzrost ich uwodnienia. Cytokininy wzmagają aktywność wielu enzymów związanych z przebiegiem reakcji biochemicznych składających się anabolizm, między innymi reduktazy azotanowej, fosfokinaz białkowych, a szczególnie kinazy histydynowo-asparaginianowej bezpośrednio związanej z molekularnym mechanizmem ich oddziaływania na genom komórkowy. W obrębie komórek cytokininy inicjują kario- i cytokinezę w podziale mitotycznym, głównie poprzez stymulację biosyntezy białek niezbędnych w tworzeniu się wrzeciona kariokinetycznego i kondensację chromosomów w chromatynę (TEYSSENDER i współaut. 1985, GAUDINOVA 1990, SUTY i współaut. 1993, 1996, GAUDINO i PIKAARD 1997, FRANK i SCHMÜLLING 1999, KOWALCZYK i JAKUBOWSKA 1999, RIOU-KHAMLIHI i współaut. 1999, SHEEN 2002).

Cytokininy, wspólnie z auksynami przy współudziale poliamin, regulują i kontrolują

ekspresję wielu genów na poziomie transkrypcji i translacji związanych ze wzrostem i rozwojem roślin, w kształtowaniu procesów cyto-, histo-, morfo- i organogenezy. Pod wpływem cytokinin następuje aktywacja wielu procesów morfogenetycznych i fizjologicznych roślin takich jak: stymulacja kiełkowania nasion fotoblastycznych, skracanie spoczynku pąków, osłabienie dominacji wierzchołkowej w pędach głównych na rzecz bocznych, indukowanie pąków przybyszowych i kwiatowych, stymulacja wzrostu, rozwoju i regeneracji tkanek: mięksiszowej, przewodzącej i skórki, przedłużenie okresu wegetacyjnego, zwiększenie stosunku objętościowego pędów nadziemnych do systemu korzeniowego, przyspieszenie rozwoju kielków roślinnych, kwiatów, owoców, nasion i pąków oraz aktywacja prawidłowego rozwoju woreczka zalążkowego i tworzenia się gamet roślinnych (LETHAM 1963, SKOOG i ARMSTRONG 1970, BORKOWSKA 1976, LEWAK i SIŃSKA 1978, ALONI 1993, JANKIEWICZ 1997).

Cytokininy odgrywają ważną rolę w układach symbiotycznych lub pasożytniczych między bakteriami lub grzybami, np. z rodzaju *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Rhizobium*, *Phyllactynia*, a roślinami wyższymi. Zwiększają tolerancję roślin na stresy temperaturowe i odporność na infekcję patogenów (NAJTO i współaut. 1978, MILLER 1985, NIETO i FRANBERGER 1990, KAMINEK i współaut. 1992, CHEN i współaut. 1993, SUTY i współaut. 1993, GAUDINO i PIKAARD 1997, SCHMÜLLING i współaut. 1997, BRAULT i MALDINEY 1999, MOK i współaut. 2000).

Aktualnie istnieją dwie główne hipotezy dotyczące aktywności biologicznej cytokinin pochodnych adeniny i mocznika. Według jednej z nich (BRUCE i współaut. 1965, KUROSAKI i współaut. 1981), z doświadczeń wykonanych na liściach i kalusie tytoniu z dodatkiem antycytokinin wynika, że obie grupy cytokinin, mimo istotnych różnic w strukturze chemicznej wykazują ten sam mechanizm działania stymulacyjnego. Prawdopodobnie mają one powinowactwo do tych samych receptorów komórkowych, gdyż obie grupy cytokinin mają identyczne miejsce aktywne biologicznie w cząsteczce, w formie fragmentu -HN-C-NH-. Również KLYACHKO i współaut. (1987) w doświadczeniach biochemicznych wykonanych na liściach dyni (*Cucurbita pepo*) wykazali, że tidiazuron i BA działają tak samo stymulująco na tworzenie się rybosomów i aktywność polimeraz RNA. Natomiast doświadczenia wykonane na

kulturze kalusa soi (*Glycine max*) przez THOMASA i KATTERMANA (1986) sugerują, że działanie stymulacyjne cytokinin mocznikowych ma charakter pośredni, gdyż mogą one pełnić rolę donora łańcucha bocznego dla naturalnych cytokinin i w ten sposób aktywują syntezę purynowych cytokinin. Wydaje się, że ta hipoteza jest najmniej prawdopodobna (IWAMURA i współaut. 1980; MOK i współaut. 1982, 1987; MOK i MOK 1985; CHANG i STEWART 1998; RICCI i współaut. 2001).

Również w odniesieniu do glonów, zwłaszcza jednokomórkowych i kolonijnych cytokinin wykazują dużą aktywność biologiczną na ich wzrost, cykl rozwojowy i procesy fizjologiczno-metaboliczne (BENTLEY-MOWAT i REID 1968, JENNIGS i współaut. 1972, VAN STADEN i BRECH 1973, AUGIER 1974, CZERPAK 1979, KENTZER i współaut. 1980, ATANASIU i współaut. 1982, CZERPAK i BAJGUZ 1997).

W ostatnich latach dzięki dużym postępom badawczym w biologii molekularnej, w znacznym stopniu poznano kaskadę reakcji biochemicznych związanych bezpośrednio z percepcją i transdukcją sygnałów hormonalnych w komórce. W transdukcji sygnału cytokinowego zasadniczą rolę spełnia kinaza histydynowo-asparaginianowa i jej antagonistą fosfataza, które poprzez fosforylację lub defosforylację odpowiednich domen białek regulatorowych aktywują bądź hamują procesy transkrypcji i translacji związane z syntezą białek (BINNS 1994, HOBBIE i współaut. 1994, BRAULT i MALDINEY 1999).

Wyniki badań z ostatnich kilkunastu lat wskazują, że kontrola ekspresji wielu genów roślinnych pod wpływem cytokinin odbywa się głównie na poziomie transkrypcji i translacji. Jednak szlak transdukcji sygnału cytokinowego w komórce roślinnej nie jest dotychczas całkowicie poznany. Wszystko wskazuje na to, że cytokinin podobnie jak pozostałe fitohormony oraz inne regulatory wzrostu i rozwoju roślin, a także hormony i cytokiny zwierzęce inicjują swój szlak transdukcji sygnału poprzez związanie się ze specyficznymi dla nich receptorami komórkowymi (GAUDINO i PIKAARD 1997, BRAULT i MALDINEY 1999, KOWALCZYK i JAKUBOWSKA 1999, SHEEN 2002).

Badania nad białkami wiążącymi cytokininę – CBP (ang. cytokinin binding protein) rozpoczęto ponad 30 lat temu (BERRIDGE i RALPH 1970), gdy po raz pierwszy zidentyfikowano je we frakcji rybosomowej. W następnych latach

obecność białek wiążących cytokininy wykazano u różnych gatunków roślin wyższych, glonów i bakterii. Białka CBP o funkcji receptorowej wyizolowano z frakcji cytozolowej, mikrosomalnej i błon tylakoidów chloroplastowych. Mają one powinowactwo do cytokinin i charakteryzują się właściwościami specyficznego wiązania ich w kompleks, który ulegając konformacyjnym zmianom zainicjuje transdukcję sygnału hormonalnego w formie kaskady biochemicznych reakcji z udziałem białka G,

kalmoduliny i kationów wapnia, będących właściwą odpowiedzią na działanie hormonu. Dotychczas nie udowodniono, że tylko białka CBP pełnią wyłącznie rolę receptorów cytokininowych i dlatego nadal prowadzone są badania nad innymi białkami o domniemanej funkcji receptorów dla cytokinin (HOBIE i współaut. 1994, BRAULT i współaut. 1997, SCHMÜLLING i współaut. 1997, CHANG i STEWART 1998, RICCI i współaut. 2001).

PODSUMOWANIE

Z dotychczasowych badań wynika, że cytokininy są syntezowane głównie *de novo* z zasady purynowej adeniny, jej nukleozydu – adenozy, lub mononukleotydów AMP, ADP bądź ATP, do których przy azocie N^6 grupy aminowej przyłącza się łańcuch izopentenylowy, pochodzący z przekształceń kwasu miewaloniczego. Szlak alternatywny wytwarzania cytokinin, który nie jest w pełni udokumentowany naukowo, polega na ich uwalnianiu podczas degradacji kwasów rybonukleinowych, głównie tRNA, a w mniejszym stopniu mRNA i rRNA. Również nie można całkowicie wykluczyć możliwości powstawania cytokinin w trakcie oksydacyjno-hydrolitycznego rozpadu nie tylko tRNA, ale także DNA, zwłaszcza w warunkach stresowych, lub podczas neutralizacji szkodliwych grup funkcyjnych w niektórych nukleotydach.

W latach 70. ubiegłego wieku zapoczątkowano badania nad receptorami białkowymi, wiążącymi roślinne hormony, które w formie kompleksu zainicjują mechanizm ich działania w obrębie komórek. W komórkach roślinnych obecność receptorów hormonalnych stwierdzono w cytozolu, nukleoplazmie, plazmolemie, retikulum endoplazmatycznym, rybosomach, chloroplastach i mitochondriach.

Okazało się, że roślinne białka receptorowe, analogicznie do receptorów komórek zwierzęcych (znacznie lepiej poznanych), wiążą się w sposób specyficzny i odwracalny ze swoistymi dlań fitohormonami. Kompleks hormon-receptor stanowi pierwsze ogniwo w łańcuchu reakcji bezpośrednio związanych z transmisją sygnału hormonalnego. Zmiany konformacyjne białka receptorowego, w wyniku połączenia z hormonem uruchamiają kaskadę reakcji biochemicznych w komórce, które stanowią właściwą odpowiedź fizjologiczno-metaboliczną na ich działanie.

W ostatnich latach dzięki nowym technikom genetyki molekularnej zaczęto coraz szczegółowiej poznawać strukturę fizyko-chemiczną receptorów fitohormonalnych, między innymi cytokinin – CBP, co w efekcie pozwoliło na dokładne poznanie molekularnych mechanizmów percepcji sygnału hormonalnego, a także odkrycie nowych ogniw w szlaku jego transdukcji. Jednakże dotychczas nie dostarczono przekonujących dowodów biochemiczno-fizjologicznych, że białka wiążące cytokininy w komórce roślinnej (CBP), na pewno, i wyłącznie tylko one spełniają funkcję receptorów komórkowych.

CYTOKININS, THEIR STRUCTURE, METABOLISM AND BIOLOGICAL ACTIVITY

S u m m a r y

Till now our knowledge of cytokinin metabolism and biosynthesis as well as molecular mechanism of their action in plant cells is still very limited. Cytokinin biosynthesis in plants occurs mainly *de novo* from adenine, a nucleoside – adenosine or mononucleotide AMP by the addition of isopentenyl side chain coming from mevalonic acid to nitrogen N^6 of amine group. An alternative indirect

biosynthesis pathways of cytokinins – incompletely proved in laboratory research – occurs *via* the hydrolysis of tRNA, which appears to be the richest source of the constituent free mononucleotides of these plant hormones.

The possible role of cytokinin in the molecular mechanism of signal perception, transmission and transduction as well as activation of expression of

many genes, mainly involved in the cell cycle, as well as formation of meristematic tissues and the process

of photosynthesis have been studied during the last years and the main results are presented.

LITERATURA

- AKIYOSHI D. E., KLEE H., AMASINO R. M., NESTER E. W., GORDON M. P., 1984. *T-DNA of Agrobacterium tumefaciens encodes an enzyme of cytokinin biosynthesis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 5994–5998.
- ALONI R., 1993. *The role of cytokinins in organised differentiation of vascular tissue*. Austr. J. Plant Physiol. 20, 4–15.
- ATANASIU L., SPIRESCU I., POLESCU L., 1982. *L'influence de la kinetine sur le croissance de l'algue Chlorella*. Rev. Roum. Biol. 1, 17–22.
- AUGIER H., 1974. *Les phytohormones des algues*. I. Etude Biochimique. Ann. Sci. Nat. Bot. 15, 1–64.
- BARCISZEWSKI J., SIBOSKA G., CLARK B. F. C., RATTAN S. I. S., 2000. *Cytokinin formation by oxidative metabolism*. J. Plant Physiol. 158, 587–588.
- BAROJA-FEMANDEZ E., AQUIRREOLEA J., MARTINKOZO H., HANUS J., STRNAD M., 2002. *Aromatic cytokinins in micropropagated potato plants*. Plant Physiol. Biochem. 40, 217–224.
- BENTLEY-MOWAT J. A., REID S. M., 1968. *Investigations of the radish leaf bioassay for kinetins and demonstration of kinetin-like substances in algae*. Ann. Bot. 32, 23–32.
- BERRIDGE M. V., RALPH R. K., 1970. *The binding of kinetin to plant ribosomes*. Biochem. J. 119, 75–84.
- BINNS A. N., 1994. *Cytokinin accumulation and action: biochemical, genetic and molecular approaches*. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 45, 173–196.
- BLACKWELL J. R., HORGAN R., 1994. *Cytokinin biosynthesis by extracts of Zea mays*. Phytochemistry 35, 339–342.
- BORKOWSKA B., 1976. *Cytokininy*. Post. Biochem. 22, 197–209.
- BORKOWSKA B., LITWIŃCZUK W., 1993. *Activity of thidiazuron in vitro shoot cultures of Prunus sp. and Morus alba*. Biol. Plant. 35, 63–67.
- BORZOBHATY B., MOORE I., PALME K., 1994. *Cytokinin metabolism: implications for regulation of plant growth and developments*. Plant Mol. Biol. 26, 1483–1497.
- BRAULT M., MALDINEY R., 1999. *Mechanism of cytokinin action*. Plant Physiol. Biochem. 37, 403–412.
- BRAULT M., MALDINEY R., MIGINIAC E., 1997. *Cytokinin-binding proteins*. Physiol. Plant. 100, 520–527.
- BRUCE M., ZWAR J., KEFFORD N., 1965. *Chemical structure and plant kinin activity-the activity of urea and tiourea derivatives*. Life Sci. 4, 461–466.
- CANOVA J., 1982. *Cytokininy i fotosintez*. Priroda 35, 23–29.
- CHANG C., STEWART R. C., 1998. *The two component system: regulation of diverse signaling pathways in prokaryotes and eukaryotes*. Plant Physiol. 117, 723–731.
- CHEN C. M., 1997. *Cytokinin biosynthesis and inter-conversions*. Physiol. Plant. 101, 665–673.
- CHEN C. M., JIN G., ANDERSEN B. R., ERTL J. R., 1993. *Modulation of plant gene expression by cytokinins*. Aust. J. Plant Physiol. 20, 609–619.
- CHEN C. M., MELITZ D. K., 1979. *Cytokinin biosynthesis in a cell free system from cytokinin-autotrophic tobacco tissue cultures*. FEBS Lett. 107, 15–20.
- CZERPAK R., 1979. *Effect of some natural and artificial growth regulators on the chemical composition of autotrophic microorganisms of the genera Anabaena, Chlorella, Scenedesmus*. Bull. Pol. Ac.: Biol. 27, 591–603.
- CZERPAK R., BAJGUZ A., 1997. *Stimulatory effect of auxins and cytokinins on carotenoids, with differential effects on xanthophylls in the green alga Chlorella pyrenoidosa Chick*. Acta Soc. Bot. Pol. 66, 41–46.
- DAVEY J. E., VAN STADEN J., 1981. *Cytokinins in spinach chloroplast*. Ann. Bot. 48, 243–246.
- ERNST D., SCHÄFER W., OESTERHELT D., 1983. *Isolation and identification of a new, naturally occurring cytokinin (6-benzylaminopurine riboside) from an old anise cell culture (Pimpinella anisum L.)*. Planta 159, 222–225.
- FRANK M., SCHMÜLLING T., 1999. *Cytokinin cycles cells*. Trends Plant Sci. 4, 243–244.
- GAUDINO R. J., PIKAARD C. S., 1997. *Cytokinin induction of RNA polymerase transcription in Arabidopsis thaliana*. J. Biol. Chem. 272, 6799–6804.
- GAUDINOVA A., 1990. *The effect of cytokinin on nitrate reductase activity*. Biol. Plant. 32, 89–96.
- GENKOV T., TSANEVA P., IVANOVA I., 1997. *Effect of cytokinins on photosynthetic pigments and chlorophyllase activity in vitro cultures of axillary buds of Dianthus caryophyllus L.* J. Plant Growth Regul. 16, 169–172.
- GERHAUSER D., BOPP M., 1990. *Cytokinin oxidases mosses metabolism of kinetin and benzyladenine in vitro*. J. Plant Physiol. 135, 714–718.
- GRAY J., GELVIN S. B., MEILAN R., MORRIS R. O., 1996. *Transfer RNA is the source of extracellular isopenentenyladenine in a Tiplasmidless strain of Agrobacterium tumefaciens*. Plant Physiol. 110, 431–438.
- GUERN J., PÉAND-LENOËL C. (red.), 1981. *Metabolism and Molecular Activities of Cytokinins*. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York.
- GWÓD E. A., WOŃNY A., 1983. *Cytokinin-controlled polyribosomes formation and protein synthesis in cucumber cotyledons*. Physiol. Plant. 59, 103–110.
- HEUTTEMAN C. A., PREECE J. E., 1993. *Thidiazuron – a potent cytokinin for woody plant tissue culture*. Plant Cell Tiss. Organ. Cult. 33, 105–119.
- HOBBIE I., TIMPTE C., ESTELLE M., 1994. *Molecular genetics of cytokin*. Plant. Mol. Biol. 26, 1499–1519.

- HORGAN R., HEWETT E. W., HORGAN J. M., PURSE J. G., WAREING P. F., 1975. *A new cytokinin from Populus robusta*. *Phytochemistry* 14, 1005–1008.
- IWAMURA H., FUJITA T., KOYAMA S., KOSHIMIZU K., KUMAZAWA Z., 1980. *Quantitative structure activity relationship of cytokinin active adenine and urea derivatives*. *Phytochemistry* 19, 1309–1319.
- JANKIEWICZ L. S., 1997. *Regulatory wzrostu i rozwoju roślin*. Tom 1. Właściwości i działanie. PWN, Warszawa.
- JELIČ G., BOGDANOVIČ M., 1990. *The relationship between chlorophyll accumulation and endogenous cytokinin in greening cotyledons of Pinus nigra Arn.* *Plant Sci.* 71, 153–157.
- JENNINGS R. C., BROUGHTON W. J., MACCOMB A. J., 1972. *Effect of kinetin on the phycoerythrin and chlorophyll content of red alga*. *Phytochemistry* 11, 1937–1943.
- JONES L. H., 1998. *Metabolism of cytokinins by tissue culture lines of oil palm (Elaeis guineensis Jacq.) producing normal and abnormal flowering palms*. *J. Plant Growth Regul.* 17, 205–214.
- KAKIMOTO T., 2001. *Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate: ATP/ADP isopentenyltransferases*. *Plant Cell Physiol.* 42, 677–685.
- KAMINEK M., MOK D. W. S., ZA IMALOVA E., 1992. *Physiology and Biochemistry of Cytokinins in Plants*. SPB Academic The Hague.
- KAMINEK M., MOTYKA V., VAŇKOVA R., 1997. *Regulation of cytokinin content in plant cells*. *Physiol. Plant.* 101, 689–700.
- KENTZER T., SYNAK R., BURKIEWICZ K., BANAŚ A., 1980. *Cytokinin-like activity in sea water and Fucus vesiculosus L.* *Biol. Plant.* 22, 218–225.
- KING R. A., VAN STADEN J., 1990. *The metabolism of N⁶(Δ²-isopentenyl) (C³H)-adenine by different stem sections of Pisum sativum J.* *Plant Growth Regul.* 9, 237–249.
- KLYACHKO N., SCHRAMM I., KUALEVA O. N., 1987. *Effect of thidiazuron and cartolin on polysome formation and growth of pumpkin cotyledons*. *Fiziol. Rast.* 34, 319–323.
- KOWALCZYK S., JAKUBOWSKA A., 1999. *Receptory etyleny, cytokinin i brassinosteroidów-transmembranowymi kinazami?* *Post. Biol. Kom.* 26, 3–32.
- KUBOWICZ D., 1982. *Współczesne poglądy na temat roli cytokinin w translacji*. *Wiad. Bot.* 26, 97–108.
- KUROSAKI F., TAKAHASI S., SHUDO K., OKAMOTO T., ISOGAI Y., 1981. *Structural and biological links between urea and purine cytokinins*. *Chem. Pharm. Bull.* 29, 3751–3753.
- LEGOCKA J., GWÓZD E. A., BRUSKA B., 1985. *The effect of kinetin on the level of proteins and lipids in cucumber cotyledons (Cucumis sativus L.)*. *Acta Physiol. Plant.* 7, 85–93.
- LEONARD N. J., HECHT S. M., SKOOG F., SCHMITZ R. Y., 1969. *Cytokinins: synthesis, mass spectra and biological activity of compounds related to zeatin*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 63, 175–182.
- LETHAM D. S., 1963. *Zeatin, a factor inducing cell division isolated from Zea mays*. *Life Sci.* 8, 569–573.
- LETHAM D. S., PALNI L. M. S., 1983. *The biosynthesis and metabolism of cytokinins*. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 34, 163–197.
- LETHAM D. S., ZHANG R., 1989. *Cytokinin translocation and metabolism in lupin species*. *Plant Sci.* 64, 161–165.
- LEWAK S., SIŃSKA I., 1978. *Hormonalna regulacja morfogenezy*. *Wiad. Bot.* 22, 3–15.
- MATSUBARA S., 1980. *Structure-activity relationships of cytokinins*. *Phytochemistry* 19, 2239–2253.
- MCGAW B. A., BURCH L. R., 1995. *Cytokinin Biosynthesis and Metabolism*. [W:] *Plant Hormones Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. DAVIES P. J. (red). Kluwer Acad. Publ., Dordrecht-Boston-London, 98–117.
- MILLER C. O., 1979. *Cytokinin inhibition of respiration by cells and mitochondria of soybean, Glycine max (L.) Merrill*. *Planta* 146, 503–511.
- MILLER C. O., 1980. *Cytokinin inhibition of respiration in mitochondria from six plant species*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 4731–4735.
- MILLER C. O., 1985. *Possible regulatory roles of cytokinins*. *Plant Physiol.* 79, 908–910.
- MILLER C. O., SKOOG F., OKUMURA F. S., VON SALTZA M. H., STRONG F. M., 1955. *Structure and synthesis of kinetin*. *J. Amer. Chem. Soc.* 77, 2662–2673.
- MILLER C. O., SKOOG F., VON SALTZA M. H., STRONG M., 1955a,b. *Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid*. *J. Amer. Chem. Soc.* 77, 1329–1334.
- MITSUI S., WAKASUGI T., SUGIURA M., 1996. *A cytokinin-binding complex from tobacco leaves*. *Plant Growth Regul.* 18, 39–43.
- MOK M. C., MARTIN R. C., MOK D. W. S., 2000. *Cytokinins: biosynthesis, metabolism and perception*. *Vitro Cell Dev. Biol. Plant* 36, 102–107.
- MOK M. C., MOK D. W. S., 1985. *The metabolism of (C¹⁴)-thidiazuron in callus tissues of Phaseolus lunatus*. *Physiol. Plant.* 65, 427–432.
- MOK M. C., MOK D. W. S., ARMSTRONG D. J., SHUDO K., ISOGAI Y., 1982. *Cytokinins activity of N-phenyl-N-1,2,3-thiadiazol-5-yl-urea (thidiazuron)*. *Phytochemistry* 21, 1509–1511.
- MOK M. C., MOK D. W. S., TURNER J. E., MUJER C. V., 1987. *Biological and biochemical effects of cytokinin active phenylurea derivatives in tissue culture systems*. *Hort Sci.* 22, 1194–1197.
- MOK D. W. S., MOK M. C., 2001. *Cytokinin metabolism and action*. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52, 89–118.
- MOORE T. C., 1989. *Cytokinesis*. [W:] *Biochemistry and physiology of plants hormones*. MOORE T. C. (red.). Springer-Verlag, Berlin-London-New York, 158–195.
- NAJTO K., TSUJI H., HATAKEYAMA I., 1978. *Effect of benzyladenine on DNA, RNA, protein and chlorophyll contents in intact bean leaves: differential responses to benzyladenine according to leaf age*. *Physiol. Plant.* 43, 367–371.
- NANDI S. K., LETHAM D. S., PALNI L. M. S., WONG O. C., SUMMONS R. E., 1989. *6-Benzylaminopurine and its glycosides as naturally occurring cytokinins*. *Plant Sci.* 61, 189–196.

- NIETO K. F., FRANKENBERGER W. T., 1990. *Microbial production of cytokinins*. [W:] *Soil Biochemistry*. t. 6. J. M. BOLLAG, G. STOTZKY, (red.). Marcel Dekker IWC, New York and Basel, 191–248.
- NOODEN L. D., LETHAM D. S., 1993. *Cytokinin metabolism and signalling in the soybean plant*. *Aust. J. Plant Physiol.* 20, 639–653.
- PLAKIDOU-DYMOCK S., DYMOCK D., HOOLEY R., 1998. *A higher plant seven-membrane receptor that influences sensitivity to cytokinins*. *Curr. Biol.* 8, 315–324.
- RICCI A., CARRA A., TORELLI A., MAGGIALI C. A., MORINI G., BRANCA C., 2001. *Cytokinin-like activity of N,N'-diphenylureas*. *Plant Sci.* 160, 1055–1065.
- RINALDI A. C., COMANDINI O., 1999. *Cytokinin oxidase: new insight into enzyme properties*. *Trends Plant Sci.* 4, 127–130.
- RIOU-KHAMLI C., HUNTLEY R., JAQMARD A., MURRAY J. A. H., 1999. *Cytokinin activation of Arabidopsis cell division through a D-type cyclin*. *Science* 283, 1541–1544.
- ROGOZIŃSKA J. H., 1969. *Struktura a aktywność cytokinin*. *Post. Biochem.* 15, 435–445.
- ROUSSAUX J., DIRENGREMEL P., CHAUVEAN L. M., 1986. *Inhibition of mitochondrial oxidations by adenine derivatives and auxin related compounds*. *J. Plant Physiol.* 123, 55–67.
- SAKAKIBARA H., SUZUKI M., TAKAI K., DEJI A., TANIGUCHI M., 1998. *A response regulator homologue possibly involved in nitrogen signal transduction mediated by cytokinin in maize*. *Plant J.* 14, 337–344.
- SCHMÜLLING T., SCHÄFFER S., ROMANOV G., 1997. *Cytokinins as regulators of gene expression*. *Physiol. Plant.* 100, 505–519.
- SCHNEIDER J., GRUSZKA M., LEGOCKA J., SZWEJKOWSKA A., 1983. *Role of cytokinins in development and metabolism of barley leaves*. *Biochem. Physiol. Pflanz.* 178, 381–390.
- SHEEN J., 2002. *Phosphorelay and transcription control in cytokinin signal transduction*. *Science* 296, 1650–1652.
- SKOOG F., ARMSTRONG D. J., 1970. *Cytokinins*. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 21, 359–384.
- SKOOG F., HAMZI H. Q., SZWEJKOWSKA A. M., LEONARD N. J., CARRAWAY K. L., FUJII T., HELGESON J. P., LOEPCKY R. N., 1967. *Cytokinins: structure, activity, relationships*. *Phytochemistry* 6, 1169–1192.
- SPYCHAŁA M., GWÓD E. A., SZWEJKOWSKA A., 1982. *The role of RNA synthesis in the cytokinin – induced enhancement of protein synthesis in the protome of Ceratodon purpureus*. *Acta Physiol. Plant.* 4, 113–122.
- STRNAD M., 1997. *The aromatic cytokinins*. *Physiol. Plant.* 101, 674–688.
- SUTY L., MOUREAUX T., LEYDECKER M. T., TEYSSENDIER B., 1993. *Cytokinin affects nitrate reductase expression through the modulation of polyadenylation of the nitrate reductase mRNA transcript*. *Plant Sci.* 90, 11–19.
- TAKAHASHI S., SHUDO K., OKAMOTO T., YAMADA K., ISOGAI Y., 1978. *Cytokinin activity of N-phenyl-N'-(4-pyridyl) urea derivatives*. *Phytochemistry* 17, 1201–1207.
- TEYSSENDIER B., AXELOS M., PEAUD - LENOËL C., 1985. *Cytokinins modulate the expression of genes encoding the protein of the light harvesting chlorophyll a/b complex*. *Plant Mol. Biol.* 5, 155–164.
- TEYSSENDIER B., JONANNEAU J. P., PEAUD - LENOËL C., 1984. *Incorporation of N⁶-benzyladenine into messenger poly(A)-RNA of tobacco cells incubated at stimulatory or cytostatic cytokinin concentration*. *Plant Physiol.* 74, 669–674.
- THOMAS J. C., KATTERMAN F. R., 1986. *Cytokinin activity induced by thidiazuron*. *Plant Physiol.* 81, 681–683.
- TUN N. N., HOLK A., SCHERER G. F. E., 2001. *Rapid increase of NO release in plant cell cultures induced by cytokinin*. *FEBS Lett.* 509, 174–176.
- VAN STADEN J., BRECH C. M., 1973. *Cytokinins in freshwater algal cultures*. *Plant Sci. Lett.* 1, 325–330.
- VAN STADEN J., DREWES F. E., 1992. *The stability and metabolism of benzyladenine glucosides in soybean callus*. *J. Plant Physiol.* 140, 92–95.
- VOLFOVA A., CHVOJKA L., FRIEDRICH A., 1979. *The effect of kinetin and auxin on the chloroplast structure and chlorophyll content in wheat coleoptiles*. *Biol. Plant.* 20, 440–445.
- WOŃNY A., 1984. *Rola cytokinin w ontogenezie plastydów*. *Post. Biol. Kom.* 11, 137–186.