


Udział genów szlaku biosyntezy cytokinin w determinacji wysokości plonu pszenicy

Contribution of cytokinin biosynthesis genes in determining wheat grain yield

Joanna Bocian  , Anna Nadolska-Orczyk 

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy

 j.bocian@ihar.edu.pl

Cytokiny to klasa fitohormonów powiązanych z kluczowymi procesami wzrostu i rozwoju roślin, w tym mającymi istotny wpływ na wysokość i cechy składowe plonu. Biosynteza cytokinin jest kontrolowana przez rodzinę genów *IPT* kodujących transferazę izopentenylową, która reguluje pierwszy, limitujący etap syntezy cytokinin. Wyróżnia się dwa rodzaje genów *IPT*: *ATP/ADP-IPT* i *tRNA-IPT*. W zależności od rodzaju genu *IPT*, kodowany enzym inicjuje odrębną ścieżkę syntezy. Każda ze ścieżek prowadzi do powstania odmiennego typu cytokinin o różnej funkcji. Analizując zawartość i skład cytokinin w roślinach dostrzeżono szczególne znaczenie *trans*- i *cis*-zeatyny w pierwszych stadiach rozwoju ziaren zbóż, kluczowych pod względem determinacji wysokości plonu. Te dwie formy cytokinin powstają w wyniku odrębnych ścieżek biosyntezy, a ich udział w rozwoju ziaren jest zależny od gatunku i genotypu. W niniejszej pracy przedstawiono znaczenie cytokinin i rodziny genów *IPT* w budowaniu potencjału plonotwórczego roślin. Podsumowano również wiedzę na temat poszczególnych genów *IPT* pszenicy oraz wzoru ich czasowo- i miejscowo-specyficznej ekspresji. W oparciu o te informacje oraz poznaną dotąd aktywność biologiczną cytokinin w poszczególnych organach roślin pszenicy i innych gatunków zbóż na różnych etapach rozwoju, wskazano na geny *IPT* o potencjalnie istotnym udziale w determinacji wysokości plonu pszenicy.

Słowa kluczowe: cytokiny; biosynteza cytokinin; rodzina genów *IPT*; plon ziarna; pszenica

Cytokinins are a class of phytohormones associated with key plant growth and development processes, including those with a significant influence on plant yield and yield components. Cytokinin biosynthesis is catalysed by isopentenyltransferase, an enzyme encoded by the *IPT* gene family members. There are two types of *IPT* genes: *ATP/ADP-IPT* and *tRNA-IPT*. Depending on the *IPT* gene, the encoded enzyme initiates a separate cytokinin biosynthesis pathway, ultimately determining the type of cytokinins produced and, consequently, their function. Both, *trans*- and *cis*-zeatin are of particular importance in the first stages of cereal grain development, which are crucial in determining grain yield. These two cytokinins are produced as a result of separate biosynthesis pathways, and their participation in grain development depends on the species and genotypes. This review presents the importance of cytokinins and the *IPT* gene family members in determining the yield potential of plants. We summarize the current status of knowledge on the wheat *IPT* genes and their spatio-temporal expression pattern. Based on this information and the known so far biological activity of cytokinins in individual organs of developing wheat and other cereal plants, *IPT* genes with a potentially significant role in determining wheat yield were indicated.

Keywords: cytokinins; cytokinin biosynthesis; *IPT* gene family; grain yield; wheat

Wprowadzenie

Jedną z obiecujących ścieżek do wykreowania wysokoplonujących odmian roślin odpornych na zmiany środowiska, jest wykorzystanie regulacji cech plonotwórczych przez fitohormony (Nguyen i in., 2020). Cytokiny są jedną z klas fitohormonów powiązanych z dużą liczbą kluczowych procesów wzrostu i rozwoju roślin oraz o udokumentowanym w licznych badaniach udziale w mechanizmach adaptacyjnych roślin do zmiennych warunków środowiska (Kieber i Schaller, 2018; Cortleven i in., 2018). Badania z ostatnich lat wskazują na istotny udział genów metabolizmu cytokinin w determinowaniu wielkości plonu zbóż. Jednym z pierwszych, opisanych loci cech ilościowych wpływających na wielkość i liczbę ziaren ryżu jest gen metabolizmu cytokinin, *OsCKX2*, kodujący enzym dehydrogenazę cytokinin, która degradowuje *trans*- i *cis*-zeatynę (*tZ*, *cZ*) oraz izopentenyloadeninę (*iP*) (Ashikari i in., 2005). Wpływ eks-

presji genów *CKX* na plonowanie potwierdził się w badaniach pszenicy, gdzie akumulacja cytokinin w ziarniakach pszenicy wynikająca z obecności haplotypu a genu *TaCKX6-D1*, charakteryzującego się obniżoną ekspresją, pozytywnie korelowała z ich masą (Zhang i in., 2012). W badaniach własnych wykazaliśmy bardzo duży wpływ genów *CKX*, na cechy plonotwórcze jęczmienia (Zalewski i in., 2010; Zalewski i in., 2012; Zalewski i in., 2014; Gasparis i in., 2019) i pszenicy (Jablonski i in., 2020; Jablonski i in., 2021a; Jablonski i in., 2021b).

W celu efektywnego wykorzystania w programach hodowlanych potencjału, jaki niesie ze sobą udział cytokinin w determinacji wysokości plonu, kluczowa jest wiedza na temat regulacji metabolizmu cytokinin na poziomie genetycznym (Nguyen i in., 2020). U pszenicy profile ekspresji i funkcje poszczególnych genów metabolizmu cytokinin są w znacznie mniejszym stopniu poznane niż u in-

nych gatunków zbóż. Spowodowane jest to utrudnieniami jakie niesie ze sobą złożoność heksaploidalnego genomu pszenicy ($2n=6x=42$, AABBDD). Prawie każdy z genów ma swoje homeologi, po jednym w każdym z trzech subgenomów A, B i D. Ponadto każdy z homeologów w danym locus może podlegać różnym genetycznym i epigenetycznym mechanizmom regulacji, specyficznym dla tkanki i fazy rozwoju rośliny (Khlestkina i in., 2008). W ciągu ostatnich kilku lat prace badawcze w tym obszarze znacznie przyspieszyły i dostępne są już pierwsze opracowania opisujące niektóre aspekty regulacji zawartości cytokinin u pszenicy (Song i in., 2012; Chen i in., 2020; Chen i in., 2021). W tej pracy podsumowana zostanie dostępna aktualnie wiedza dotycząca ekspresji genów *IPT* regulujących pierwszy etap biosyntezy cytokinin i ich potencjalnego wpływu na cechy związane z plonowaniem pszenicy.

Znaczenie cytokinin

Pierwszą cytokininę odkryto w latach 50. XX. wieku. Analizy funkcjonalne wykazały w tym czasie, że jest ona czynnikiem stymulującym podziały komórkowe (Miller i in., 1955). Obecnie znany jest udział tej grupy związków w regulacji szeregu innych procesów związanych z zarówno wegetatywnym jak i generatywnym rozwojem roślin. Cytokiny uczestniczą m.in. w różnicowaniu komórek, przełamują dominację wierzchołkową, promują formowanie pędów, regulują wielkość organów, opóźniają starzenie się liści, kontrolują przemiany rozwojowe takie jak kiełkowanie i kwitnienie, a także biorą udział w odpowiedzi roślin na stropy biotyczne i abiotyczne (Kieber i Schaller, 2014).

W komórkach merystemów cytokiny spełniają różne funkcje regulacyjne w zależności od organu rośliny. W merystemie wierzchołkowym pędu stymulują podziały komórkowe i przeciwdziałają dyferencjacji komórek, przez co przyczyniają się do zwiększania nadziemnej biomasy roślin (Sakamoto i in., 2006; Holst i in., 2011). Przeciwnie działają wykazują w merystemach korzeni, gdzie inicjując różnicowanie komórek, w konsekwencji negatywnie wpływają na architekturę i masę systemu korzeniowego (Dello Ioio i in., 2007; Werner i in., 2010; Ramireddy i in., 2018).

Cytokiny, regulując rozwój organów generatywnych, a tym samym determinując wielkość kwiatów, czas kwitnienia czy formowania załączków, rozwój i dojrzewanie nasion, mają bezpośredni wpływ na wielkość plonu roślin. Indywidualna masa ziaren zbóż determinowana jest liczbą komórek endospermy i poziomem ich wypełnienia. Cytokiny korzystnie wpływają na te cechy stymulując podziały komórkowe i wzmacniając transfer asymilatów do komórek endospermy (Rijavec i in., 2011; Terceros i in., 2020; Nguyen i in., 2021).

Regulacyjne właściwości cytokinin są wykorzystywane w odpowiedzi roślin na różnego rodzaju stropy środowiskowe, jak np. susza, zbyt silne nasłwetlenie, niska i wysoka temperatura czy niedobór/nadmiar składników pokarmowych w podłożu. Geny metabolizmu cytokinin dynamicznie reagują na zaistniałe warunki stresowe oraz na inne fitohormony (Cortleven i in., 2018).

Udział cytokinin w procesach rozwojowych i adaptacyjnych roślin potwierdzają analizy sekwencji promotorowych genów metabolizmu cytokinin przeprowadzonych u rzodkiewnika, ryżu i pszenicy. Wykazały one obecność motywów i elementów rozwojowo-regulatorowych oraz elementów *cis*-regulatorowych, powiązanych z odpowiedzią roślin na abiotyczne i biotyczne czynniki stresowe oraz z regulacją fitohormonalną (Ghosh i in., 2018; Shoaib i in., 2019; Iqbal i in., 2022).

Rodzaje i metabolizm cytokinin

Cytokiny występują u roślin w przynajmniej 32 formach (Kisiala i in., 2019), które różnią się pomiędzy sobą strukturą, biochemicznymi właściwościami, aktywnością biologiczną oraz możliwościami transportu pomiędzy organami rośliny (Durán-Medina i in., 2017; Nguyen i in., 2020). Właściwości te mogą być modulowane w wyniku reakcji enzymatycznych zmieniających formy cytokinin (Kieber i Schaller, 2014). Wszystkie związki należące do tej grupy fitohormonów to pochodne adeniny z łańcuchem bocznym w pozycji N⁶, mającym postać łańcucha izoprenowego lub aromatycznego. W roślinach wyższych znacznie powszechniej występują cytokiny izoprenowe, dlatego prowadzone badania pod względem funkcji i ścieżek metabolicznych cytokinin dotyczą w znacznej przewadze tej grupy (Kamada-Nobusada i Sakakibara, 2009; Hluska i in., 2021). Cytokiny izoprenowe można podzielić na cytokiny typu *tZ*, *cZ*, *iP* i dihydrozeatyny (*DZ*). Poszczególne typy różnią się pod względem obecności lub braku grupy hydroksylowej na końcu łańcucha izoprenowego oraz jej stereoizometrycznej pozycji (Kamada-Nobusada i Sakakibara, 2009). Metabolizm i aktywność biologiczna danych typów cytokinin są definiowane przez poszczególne modyfikacje łańcucha bocznego (Kiba i in., 2013; Hluska i in., 2021). Za aktywne biologicznie, czyli zdolne do efektywnego wiązania się z receptorami, uznawane są głównie cytokiny w formie wolnych zasad (Kieber i Schaller, 2014; Romanov i Schmölling, 2021), jednak istnieją również badania dokumentujące wiązanie się z receptorami w formie rybozydów (Jaworek i in., 2020; Matušková i in., 2023).

Homeostaza cytokinin w roślinie jest złożona i zależy głównie od enzymów odpowiadających za ich kluczowe szlaki metaboliczne, przede wszystkim biosyntezę, aktywację, inaktywację, reaktywację i degradację cytokinin (Nguyen i in., 2021).

Każda grupa enzymów kodowana jest przez odrębną rodzinę genów, a poszczególne geny w danej rodzinie mogą być funkcjonalnie scharakteryzowane w oparciu o czasowo-przestrzenny wzór ich ekspresji (Sakamoto i in., 2006). W ostatnich latach opublikowano wiele prac dotyczących genów metabolizmu cytokinin. Nguyen i in. (2021) podjęli temat biosyntezy cytokinin w różnych gatunkach roślin wyższych. Sakakibara (2021) opisał biosyntezę, aktywację i transport cytokinin, a Chen z zespołem omówili temat aktywacji cytokinin w różnych gatunkach roślin (Chen i in., 2022) oraz inaktywacji i reaktywacji (Chen i in., 2021) i degradacji (Chen i in., 2020) cytokinin w pszenicy.

Podobnie jak geny metabolizmu cytokinin ulegają czasowo-przestrzennej ekspresji, tak i poszczególne typy cytokinin mają charakterystyczne miejsca biosyntezy/gromadzenia w roślinie (Rijavec i in., 2011; Nguyen i in., 2021; Ptošková i in., 2022). Identyfikacja cytokinin w wiązках przewodzących, liściach i korzeniach umożliwiła zaobserwowanie zróżnicowanego transportu różnych typów cytokinin w różnych kierunkach. W soku floemowym dominowały cytokininy typu iP przemieszczane systemowo lub z pędów do korzeni, a w soku ksylemowym cytokininy typu tZ transportowane z korzeni do pędów (Corbesier i in., 2003; Hirose i in., 2008; Kudo i in., 2010; Ko i in., 2014; Osugi i in., 2017). Transport polarny poszczególnych typów cytokinin może być wyjaśniony zróżnicowanym powinowactwem do transporterów cytokinin zlokalizowanych w obrębie wiązki przewodzącej (Hirose i in., 2005; Hirose i in., 2008; Kang i in., 2017) oraz zróżnicowaną aktywnością enzymów kodowanych przez rodzinę genów metabolizmu cytokinin, *CYP735A*, w różnych organach roślin. Geny te kodują enzym przekształcający cytokininy typu iP do tZ poprzez dodanie grupy hydroksylowej na końcu łańcucha izopentenylowego. Wykazano, że geny *CYP735A* ulegają silnej ekspresji w korzeniu; natomiast w liściach ich poziom ekspresji był znacznie niższy lub niewykrywalny (Takei i in., 2004; Kiba i in., 2013). Występowanie w wiązках przewodzących poszczególnych typów cytokinin oraz zróżnicowanie ich form w obrębie danego typu mogą być różne w zależności od gatunku rośliny i warunków środowiska (Hirose i in., 2008; Osugi i in., 2017; Veselov i in., 2018).

Transferaza izopentenylowa

Pierwszym, kluczowym etapem biosyntezy cytokinin izoprenowych jest przyłączenie łańcucha izopentenylowego do cząsteczki ADP, ATP lub tRNA. Reakcję tę katalizuje enzym transferaza izopentenylowa. Wielokrotnie podejmowano próby wyizolowania i scharakteryzowania tego enzymu u roślin, jednak napotymano trudności ze względu na jego niską koncentrację i niestabilność

(Ghosh i in., 2018). Transferaza izopentenylowa kodowana jest przez rodzinę genów *IPT*, wśród których wyróżnia się dwie odrębne grupy: *ATP/ADP-IPT* i *tRNA-IPT*. Za biosyntezę *de novo* cytokinin typu iP, tZ i DZ odpowiadają geny *ATP/ADP-IPT*, które kodują enzym wykorzystujący preferencyjnie ATP lub ADP jako substraty. Geny *tRNA-IPT* są odpowiedzialne za biosyntezę cytokinin typu cZ, która odbywa się poprzez transfer grupy izopentenylowej do pozycji N⁶ adeniny w cząsteczce tRNA (Miyawaki i in., 2006; Kieber i Schaller, 2014).

W genomie pszenicy zidentyfikowano 9 podstawowych genów *IPT*, z których większość jest obecna we wszystkich trzech subgenomach A, B i D. Wyjątek stanowi *TaIPT4*, który występuje jedynie w genomie B (Shoaib i in., 2019; Wang i in., 2023). U diploidalnego rzodkiewnika, kukurydzy i ryżu zidentyfikowano podobną liczbę genów *IPT*, odpowiednio 9, 9 i 10 (Miyawaki i in., 2006; Brugière i in., 2008; Sakamoto i in., 2006). Większość składa się z jednego egzonu. Wyjątkami są *TaIPT10*, którego homeologi mają po dwa egzony oraz *TaIPT9*, mający w swojej sekwencji 11 egzonów. Długości sekwencji aminokwasowych kodowanych przez geny *TaIPT* wynoszą od 280 do 466 reszt. (Shoaib i in., 2019; Wang i in., 2023).

Wśród genów *IPT* rzodkiewnika, dwa z nich, *AtIPT2* i *AtIPT9* rozpoznano jako *tRNA-IPT*. Tę klasyfikację potwierdzają badania, w których u podwójnych mutantów *atipt2 9* stwierdzono spadek zawartości cZ w roślinach do niewykrywalnego poziomu. U pojedynczych mutantów *atipt2* i *atipt9* obserwowano obniżenie poziomu cZ w stosunku do osobników nietransformowanych. U żadnego z mutantów nie stwierdzono zmian w zawartości cytokinin typu iP i tZ. U mutantów *atipt9* i *atipt2 9* często występował efekt fenotypowy w postaci chloroz (Miyawaki i in., 2006). Obydwa geny ulegają ekspresji w całej roślinie, a najwyższy jej poziom obserwowano w tkankach merystematycznych. Zauważono również, że poziom ekspresji tych genów nie zmieniał się pomimo traktowania roślin solami mineralnymi zawierającymi różne stężenia azotu, auksynami i cytokinami, podczas gdy poziomy ekspresji wszystkich pozostałych genów *AtIPT* zmieniały się w odpowiedzi na przynajmniej jeden z wymienionych czynników (Miyawaki i in., 2004). Na podstawie przeprowadzonych analiz filogenetycznych sekwencji genów *IPT* pszenicy, rzodkiewnika, ryżu i kukurydzy można wnioskować, że u pszenicy do grupy genów *tRNA-IPT* należą geny *TaIPT9* i *TaIPT10* (Shoaib i in., 2019; Wang i in., 2023).

Występowanie dwóch odmiennie regulowanych ścieżek syntezy cytokinin, stwierdzona niska aktywność biologiczna cZ w porównaniu do iP i tZ oraz obserwacje wyniesione z badań na mutantach *atipt* rzodkiewnika przyczyniły się do wy-

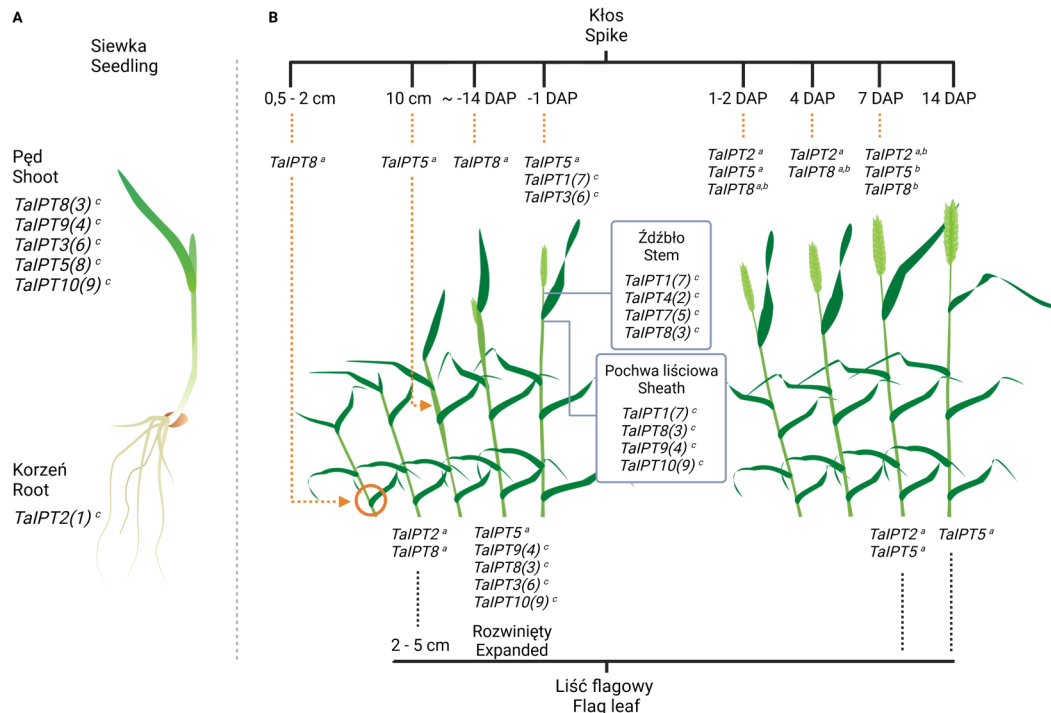
sunięcia hipotezy, że geny *ATP/ADP-IPT* i cytokininy typu *iP/tZ* mogą być powiązane z regulacją organogenezy i odpowiedzią na stresy środowiskowe, a geny *tRNA-IPT* oraz związane z nimi cytokininy typu *cZ* odgrywają głównie rolę genów metabolizmu podstawowego (Wang i in., 2020). Jednak *cZ* nie zawsze wykazuje niską aktywność biologiczną. Zaobserwowano zdarzenia, w których wiązała się z wybranymi receptorami cytokinin podobnie efektywnie jak pozostałe wolne zasady (Yonekura-Sakakibara i in., 2004; Choi i in., 2012). Preferencje receptorów do wiązania określonych form cytokinin różnią się pomiędzy gatunkami i poszczególnymi organami roślin (Spichal i in., 2004; Yonekura-Sakakibara i in., 2004; Stolz i in., 2011; Choi i in., 2012; Daudu i in., 2017). Wskazuje to na konieczność indywidualnego podejścia do gatunku i odpowiedniego doboru analizowanego materiału w badaniach dotyczących metabolizmu cytokinin.

Analizy poziomu ekspresji rodzin genów w różnych organach i tkankach rozwijających się roślin pozwalają na uzyskanie wstępnej ich charakterystyki i przypuszczalnej roli w rozwoju. Pierwsze i dotąd najbardziej obszerne badanie poziomu ekspresji genów *IPT* pszenicy wykonali Song i in. (2012). Sprawdzili poziom ekspresji pięciu genów *IPT* (*TaIPT2*, *TaIPT3*, *TaIPT5*, *TaIPT7* i *TaIPT8*) w rozwijających się kwiatostanach, liściach flagowych i dojrzewających ziarniakach. Specyficznym wzorem ekspresji w badanych tkankach wyróżniły się geny *TaIPT2*, *TaIPT5* i *TaIPT8*. Wszystkie trzy wykazywały wzmózoną ekspresję od momentu rozpoczęcia pylenia, a najwyższy poziom ekspresji obserwowano w 2 dniu po zapyleniu (DAP ang. days after pollination). Najbardziej gwałtowny i zarazem najwyższy skok poziomu ekspresji w porównaniu do pozostałych genów zaobserwowano dla genu *TaIPT2*. Jego wzmózona ekspresja utrzymywała się od rozpoczęcia pylenia do 7 DAP. Tak silna specyficzność względem jednego etapu rozwojowego sygnalizuje, że *TaIPT2* może pełnić szczególnie istotną rolę w pierwszych dniach rozwoju ziarna pszenicy. Potwierdzają to badania Nguyen i in. (2020), w których stwierdzono, że odmiany wysokoplonujące miały około 2-krotnie wyższy poziom ekspresji *TaIPT2* w ziarnach kłosów 1–2 DAP niż słabiej plonujące odmiany. Geny *TaIPT5* i *TaIPT8* dodatkowo wykazywały wzmózoną ekspresję podczas rozwoju kwiatostanu. Gen *TaIPT8* miał wyższy poziom ekspresji we wczesnej fazie rozwoju, kiedy kwiatostan był długości około 0,5–2 cm; gen *TaIPT5* ulegał wyższej ekspresji później, w kwiatostanie długości około 10 cm. Wzmózona ekspresja na tym etapie rozwoju wskazuje, że geny *TaIPT5* i *TaIPT8* mogą mieć dodatkowo wpływ na wielkość kłosów/ liczbę kłosków w kłosie, podczas gdy aktywność genów *IPT* w pierwszych dniach po zapyleniu prawdopodobnie przekłada

się na końcową liczbę ziaren, wspierając zapłodnienie oraz wielkość ziaren w wyniku stymulacji podziałów komórkowych przez cytokininy. Geny *TaIPT3* i *TaIPT7* miały bardzo niski poziom ekspresji w niemal wszystkich badanych próbkach, co sugeruje, że nie odgrywają one znaczącej roli w rozwoju generatywnym pszenicy (Song i in., 2012; Terceros i in., 2020). Graficzne przedstawienie specyfiki ekspresji genów *TaIPT* w określonych organach zaprezentowano na Rys. 1.

Wzmózona ekspresja genów *TaIPT* w rozwijających się ziarnach zbiega się w czasie z obserwowaną u nich akumulacją cytokinin. Nguyen i in. (2020) zbadali, że najwyższa, ogólna zawartość cytokinin występowała w ziarnach z kłosów 1–2 i 4 DAP, przy czym w kłosie 4 DAP wystąpiła najwyższa zawartość aktywnych cytokinin w formie wolnych zasad. Wśród nich, u wszystkich badanych odmian dominowały *tZ* i *cZ*. Podobne wyniki wskazujące na istotną rolę tych dwóch izomerów zeatyny na wczesnym etapie rozwoju ziaren uzyskano u ryżu (Takagi i in., 1989; Yang i in., 2002) i jęczmienia (Powell i in., 2013). Wczesne stadia rozwoju ziarna trwające od momentu pojawienia się liścia flagowego do 7 DAP to okres krytyczny w determinacji wysokości plonu zbóż (Terceros i in., 2020; Beznec i in., 2021). Zbiegają się one w czasie z etapem intensywnych podziałów komórkowych, wspomnianym w poprzednim akapicie, podczas którego determinowana jest liczba komórek endospermy (Yu i in., 2016) oraz z translokacją asymilatów z liści do rozwijających się nasion, rozpoczynającą się od momentu pylenia (Ma i in., 2023).

Jedna z trzech badanych przez Nguyen i in. (2020), wysokoplonujących odmian pszenicy różniła się znacząco od pozostałych składem i ogólną zawartością cytokinin. W stadium kłosa 4 DAP *tZ* występowała w ziarnach na bardzo niskim poziomie, natomiast zawartość *cZ* była niemal 2-krotnie wyższa niż u pozostałych odmian. Różniła się także istotnie zawartością kwasu absycynowego (ABA) – fitohormonu biorącego udział w odpowiedzi na stresy środowiskowe. W przypadku tej odmiany poziom ABA zaczął podnosić się na wcześniejszych etapach rozwoju ziarniaków niż u pozostałych odmian. Cytokininy biorą również udział w odpowiedzi roślin na stresy biotyczne i abiotyczne. Często w wyniku stresu dochodzi do negatywnej regulacji ekspresji genów *IPT* oraz wyraźnego spadku poziomu cytokinin (Cortleven i in., 2018; Pavlu i in., 2018). Możliwe, że podczas wzrostu badanych roślin zaistniał pewien czynnik stresowy, który w konsekwencji spowodował zahamowanie syntezy *tZ*. Rolę tej aktywnej cytokininy mogła przejąć *cZ*, dzięki czemu rośliny nie poniosły strat w plonie nasion (Nguyen i in., 2020). Na możliwość takiej adaptacji funkcji przez *cZ* w warunkach stresowych wskazał Schäfer i in. (2015).



Rys. 1. Ekspresja genów *TaIPT* w siewkach (A) oraz w kłosach i liściach flagowych w różnych fazach rozwoju rośliny pszenicy (B). Litery w indeksie górnym przy nazwach genów odnoszą do źródła informacji: Song i in., 2012 (a), Nguyen i in., 2020 (b), Wang i in., 2023 (c). Geny *TaIPT* zbadane przez Wang i in. (2023) zostały podane zgodnie z nazewnictwem stosowanym przez Song i in. (2012), Shoaib i in. (2019) i Nguyen i in. (2020). W nawiasach podano oryginalną numerację stosowaną przez autorów. Przygotowany w BioRender.com

Fig. 1. Expression of *TaIPT* genes in seedlings (A), spikes, and flag leaves at different stages of wheat plant growth (B). The superscript letters after gene names refer to the source: Song et al., 2012 (a), Nguyen et al., 2020 (b), Wang et al., 2023 (c). The *TaIPT* genes investigated by Wang et al. (2023) are named consistently with the names used by Song et al. (2012), Shoaib et al. (2019), and Nguyen et al. (2020). The names given by the authors are in parentheses. Created with BioRender.com

Modyfikacje genetyczne

Pozytywny wpływ cytokinin na plonowanie oraz ich udział w odpowiedzi roślin na stresy środowiskowe jest powodem, dla którego podejmuje się próby modyfikacji ich stężenia w roślinie poprzez egzogeniczną aplikację lub manipulację ich metabolizmem na poziomie genetycznym. Większość prowadzonych badań związanych z inaktywacją wybranych genów z rodziny *IPT* lub wprowadzaniem (poprzez transformację genetyczną) nowych genów *IPT* w celu ich nadekspresji w różnych gatunkach roślin przekładały się głównie na obserwowane efekty uwrażliwienia lub podniesienia tolerancji roślin na stresy środowiskowe (Nguyen i in., 2021). Badania u rzodkiewnika, ryżu i kukurydzy wykazały, że nadekspresja genów *IPT* w wyniku wprowadzenia nowego genu *IPT* do genomu, może podnieść tolerancję roślin na stresy osmotyczne i/lub opóźnić starzenie liści (Rivero i in., 2007; Peleg i in., 2011; Reguera i in., 2013; Décima Oneto i in., 2016; Song i in., 2022). Efekty nadekspresji wprowadzonego genu *IPT* są bardzo różne w zależności od zastosowanego promotora kontrolującego ich ekspresję. W badaniach, w których zastosowano promotory konstytutywne, często obserwowano systemiczny wzrost poziomu cytokinin i niecelowe zmiany wzrostu,

jak nadmierne rozgałęzianie czy hamowanie wzrostu korzeni (Jameson i in., 2016). Systemiczny wzrost poziomu cytokinin możliwy był także w przypadku zastosowania tkankowo-specyficznego promotora - obserwowano, że nadmiar cytokinin był transportowany do innych organów oddalonych od miejsca syntezy (Atkins i in., 2011). W badaniach dotyczących odporności na stresy środowiskowe zauważono, że w zależności od zastosowanego promotora w transgenicznym konstrukcie, a dokładniej od warunków jego aktywacji, podniesiona ekspresja *IPT* mogła powodować obniżenie lub też podniesienie zawartości ABA. Tym samym modyfikowała w różny sposób homeostazę hormonalną roślin (Nguyen i in., 2021).

Przeprowadzono również kilkakrotnie modyfikacje genetyczne pszenicy związane z genami *IPT*. Przykładem jest transgeniczna pszenica z wprowadzonym, metodą biolistyczną, genem *IPT* pochodzącym z *Agrobacterium tumefaciens* pod promotorem *SARK*, która wykazywała wyraźne niższą stratę plonu w warunkach suszy w porównaniu do osobników nie transformowanych (Bezruc i in., 2021). Joshi i in. (2019) wprowadzili do pszenicy gen *IPT* z *A. tumefaciens* pod tkankowo-specyficznym promotorem *AtMYB32xs*. Otrzymane rośliny miały opóźnione starzenie liści

oraz zwiększoną tolerancję na niedobór wody. Wang i in. (2023) wykorzystując system CRISPR-Cas9 dezaktywowali wszystkie homeologi genu *TaIPT8* (poprzednio *TaIPT5* u Song i in., 2012, Nguyen i in., 2020 i Shoaib i in., 2019) oraz uzyskali rośliny z nadekspresją genu *TaIPT8* warunkowaną stresem suszy (*PNAC48::TaIPT8*). W mutantach *taipt8* stwierdzono znaczący spadek poziomu *tZ*, podniesienie poziomu *cZ* oraz zwiększenie wrażliwości na stres suszy. W liniach transgenicznym z nadekspresją genu *TaIPT8* stwierdzono zwiększoną tolerancję na wystąpienie niedoboru wody. Przyniesione badania pokazują, że podniesiony poziom ekspresji genów *IPT* może mieć korzystny wpływ na tolerancję stresu suszy przez pszenicę.

Podsumowanie

Przedstawione w pracy przeglądowej badania pozwalają wysunąć wniosek, że modyfikacje genetyczne w obrębie rodziny genów *IPT* mogą wpłynąć na cechy związane z plonowaniem w warunkach normalnych i/lub w stresie suszy. Poprawa plonowania pszenicy może zostać osiągnięta

poprzez wprowadzenie dodatkowych kopii genów syntezy cytokinin, w szczególności *TaIPT2*, *TaIPT5* i *TaIPT8*, w celu wywołania nadekspresji i zwiększenia zawartości cytokinin (Song i in., 2012; Nguyen i in., 2020). Innym rozwiązaniem jest wybór do hodowli genotypów wykazujących wyższy poziom ekspresji wybranych genów biosyntezy cytokinin. Niezbędne są dalsze prace w kierunku analizy poziomu ekspresji genów *TaIPT1*, *TaIPT4*, *TaIPT9* i *TaIPT10*. Korzystne byłoby również wykonanie analiz korelacji pomiędzy czasowo- i miejscowo-specyficzną ekspresją poszczególnych genów *TaIPT* w różnych tkankach, a akumulowanym w tym czasie typem cytokininy.

Praca została opracowana w ramach grantu OPUS 19 nr: UMO2020/37/B/NZ9/00744 finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki

Rys. 1. Przygotowano przy pomocy programu CorelDRAW II i BioRender.com

Literatura

- Atkins, C.A., Emery, R.N., Smith, P.M. (2011). Consequences of transforming narrow leafed lupin (*Lupinus angustifolius* [L.]) with an *IPT* gene under control of a flower-specific promoter. *Transgenic Res.* 20: 1321–1332. <https://doi.org/10.1007/s11248-011-9497-7>
- Beznec, A., Faccio, P., Miralles, D.J., i in. (2021) Stress-induced expression of *IPT* gene in transgenic wheat reduces grain yield penalty under drought. *J Genet Eng Biotechnol.* 19(1): 67. <https://doi.org/10.1186/s43141-021-00171-w>
- Brugière, N., Humbert, S., Rizzo, N., Bohn, J., Habben, J. E. (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. *Cytokinin biosynthesis in maize.* *Plant Mol. Biol.* 67(3): 215–229. <https://doi.org/10.1007/s11103-008-9312-x>
- Chen, L., Zhao, J., Song, J., Jameson, P.E. (2020). Cytokinin dehydrogenase: a genetic target for yield improvement in wheat. *Plant Biotechnol. J.* 18(3): 614–630. <https://doi.org/10.1111/pbi.13305>
- Chen, L., Zhao, J., Song, J., Jameson, P.E. (2021). Cytokinin glucosyl transferases, key regulators of cytokinin homeostasis, have potential value for wheat improvement. *Plant Biotechnol. J.* 19. <https://doi.org/10.1111/pbi.13595>
- Choi, J., Lee, J., Kim, K., Cho, M., Ryu, H., An, G., Hwang, I. (2012). Functional identification of *OsHk6* as a homotypic cytokinin receptor in rice with preferential affinity for iP. *Plant Cell Physiol.* 53: 1334–1343. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcs079>
- Corbesier, L., Prinsen, E., Jacquard, A., Lejeune, P., Onckelen, H., Périlleux, C., Bernier, G. (2003). Cytokinin levels in leaves, leaf exudate and shoot apical meristem of *Arabidopsis thaliana* during floral transition. *J. Exp. Bot.* 54: 2511–7. <https://doi.org/10.1093/jxb/erg276>
- Cortleven, A., Leuendorf, J.E., Frank, M., Pezzetta, D., Bolt, S., Schmülling, T. (2019). Cytokinin action in response to abiotic and biotic stresses in plants. *Plant Cell Environ.* 42(3): 998–1018. <https://doi.org/10.1111/pce.13494>
- Daudu, D., Allion, E., Liesecke, F., Papon, N., Courdavault, V., Dugé de Bernonville, T., Mélin, C., Oudin, A., Clastre, M., Lanoue, A., Courtois, M. (2017). CHASE-containing histidine kinase receptors in apple tree: from a common receptor structure to divergent cytokinin binding properties and specific functions. *Front. Plant Sci.* 8: 1614–1629. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01614>
- Décima Oneto, C.D., Otegui, M.E., Baroli, I., Beznec, A., Faccio, P., Bossio, E., Blumwald, E., Lewi, D. (2016). Water deficit stress tolerance in maize conferred by expression of an *isopentenyltransferase* (*IPT*) gene driven by a stress- and maturation-induced promoter. *J. Biotechnol.* 220: 66–77. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.01.014>
- Dello Ioio, R., Linhares, F. S., Scacchi, E., Casamitjana-Martinez, E., Heidstra, R., Costantino, P., Sabatini, S. (2007). Cytokinins determine *Arabidopsis* root-meristem size by controlling cell differentiation. *Curr. Biol.* 17(8): 678–682. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.02.047>
- Durán-Medina, Y., Díaz-Ramírez, D., Marsch-Martínez, N. (2017). Cytokinins on the move. *Front. Plant Sci.* 8: 146. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00146>
- Gasparis, S., Przyborowski, M., Kala, 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(8): 782. <https://doi.org/10.3390/cells8080782>
- Ghosh, A., Shah, M.N., Jui, Z.S., Saha, S.K., Fariha, K.A., Islam, T. (2018). Evolutionary variation and expression profiling of *Isopentenyl transferase* gene family in *Arabidopsis thaliana* L. and *Oryza sativa* L. *Plant Gene.* 15 (7): 15–27. <https://doi.org/10.1016/j.plgene.2018.06.002>
- Hirose, N., Makita, N., Yamaya, T., Sakakibara, H. (2005). Functional characterization and expression analysis of a gene, *OsENT2*, encoding an equilibrative nucleoside transporter in rice suggest a function in cytokinin transport. *Plant Physiol.* 138: 196–206. <https://doi.org/10.1104/pp.105.060137>

- Hirose, N., Takei, K., Kuroha, T., Kamada-Nobusada, T., Hayashi, H., Sakakibara, H. (2008). Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation. *J. Exp. Bot.* 59: 75-83. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm157>
- Hluska, T., Hlusková, L., Emery, R.J.N. (2021). The Hulks and the deadpools of the cytokinin universe: A dual strategy for cytokinin production, translocation, and signal transduction. *Biomolecules.* 11(2): 209. <https://doi.org/10.3390/biom11020209>
- Holst, K., Schmülling, T., Werner, T. (2011). Enhanced cytokinin degradation in leaf primordia of transgenic *Arabidopsis* plants reduces leaf size and shoot organ primordia formation. *J. plant physiol.* 168(12): 1328-1334. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2011.03.003>
- Iqbal, A., Bocian, J., Hameed, A., Orczyk, W., Nadolska-Orczyk, A. (2022). *Cis*-regulation by *NACs*: A promising frontier in wheat crop improvement. *Int. J. Mol. Sci.* 23(23): 15431. <https://doi.org/10.3390/ijms232315431>
- Jablonski, B., Bajguz, A., Bocian, J., Orczyk, W., Nadolska-Orczyk, A. (2021b). Genotype-dependent effect of silencing of *TaCKX1* and *TaCKX2* on phytohormone crosstalk and yield-related traits in wheat. *Int. J. Mol. Sci.* 22(21): 11494. <https://doi.org/10.3390/ijms222111494>
- Jablonski, B., Ogonowska, H., Szala, K., Bajguz, A., Orczyk, W., Nadolska-Orczyk, A. (2020). Silencing of *TaCKX1* mediates expression of other *TaCKX* genes to increase yield parameters in wheat. *Int. J. Mol. Sci.* 21(13): 4809. <https://doi.org/10.3390/ijms21134809>
- Jablonski, B., Szala, K., Przyborowski, M., Bajguz, A., Chmur, M., Gasparis, S., Orczyk, W., Nadolska-Orczyk, A. (2021a). *TaCKX2.2* genes coordinate expression of other *TaCKX* family members, regulate phytohormone content and yield-related traits of wheat. *Int. J. Mol. Sci.* 22(8): 4142. <https://doi.org/10.3390/ijms22084142>
- Jameson, P.E., Song, J. (2016). Cytokinin: a key driver of seed yield. *J. Exp. Bot.* 67: 593-606. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv461>
- Jaworek, P., Tarkowski, P., Hluska, T., Kouřil, Š., Vrobel, O., Nisler, J., Kopečný, D. (2019). Characterization of five CHASE-containing histidine kinase receptors from *Populus × canadensis* cv. *Robusta* sensing isoprenoid and aromatic cytokinins. *Planta.* 251(1): 1. <https://doi.org/10.1007/s00425-019-03297-x>
- Joshi, S., Choukmath, A., Isenegger, D., Panozzo, J., Spangenberg, G., Kant, S. (2019). Improved wheat growth and yield by delayed leaf senescence using developmentally regulated expression of a cytokinin biosynthesis gene. *Front. Plant Sci.* 10: 1285. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01285>
- Kamada-Nobusada, T., Sakakibara, H. (2009). Molecular basis for cytokinin biosynthesis. *Phytochemistry.* 70(4): 444-449. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.02.007>
- Kang, J., Lee, Y., Sakakibara, H., Martinoia, E. (2017). Cytokinin transporters: GO and STOP in signaling. *Trends Plant Sci.* 22(6): 455-461. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.03.003>
- Khlestkina, E.K., Röder, M.S., Salina, E.A. (2008). Relationship between homoeologous regulatory and structural genes in allopolyploid genome - a case study in bread wheat. *BMC Plant Biol.* 8: 88. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-8-88>
- Kiba, T., Takei, K., Kojima, M., Sakakibara, H. (2013). Side-chain modification of cytokinins controls shoot growth in *Arabidopsis*. *Dev. Cell.* 27: 452-61. <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2013.10.004>
- Kieber, J.J., Schaller, G.E. (2014). Cytokinins. *The Arabidopsis Book.* 12: e0168. <https://doi.org/10.1199/tab.0168>
- Kieber, J.J., Schaller, G.E. (2018). Cytokinin signaling in plant development. *Development* 145(4): dev149344. <https://doi.org/10.1242/dev.149344>
- Kisiala, A., Kambhampati, S., Stock, N.L., Aoki, M., Emery, R.N. (2019). Quantification of cytokinins using high-resolution accurate-mass orbitrap mass spectrometry and parallel reaction monitoring (PRM). *Anal. Chem.* 91: 15049-15056. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b03728>
- Ko, D., Kang, J., Kiba, T., Park, J., Kojima, M., Do, J., Kim, K. Y., Kwon, M., Endler, A., Song, W. Y., Martinoia, E., Sakakibara, H., Lee, Y. (2014). *Arabidopsis ABCG14* is essential for the root-to-shoot translocation of cytokinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111(19): 7150-7155. <https://doi.org/10.1073/pnas.1321519111>
- Kudo, T., Kiba, T., Sakakibara, H. (2010). Metabolism and long-distance translocation of cytokinins. *J. Integr. Plant Biol.* 52(1): 53-60. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2010.00898.x>
- Ma, B., Zhang, L., He, Z. (2023). Understanding the regulation of cereal grain filling: The way forward. *J. Integr. Plant Biol.* 65: 526-547. <https://doi.org/10.1111/jipb.13456>
- Matušková, V., Zatloukal, M., Pospíšil, T., Voller, J., Vylíčilová, H., Doležal, K., Strnad, M. (2023). From synthesis to the biological effect of isoprenoid 2'-deoxyriboside and 2',3'-dideoxyriboside cytokinin analogues. *Phytochemistry.* 205: 113481. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2022.113481>
- Miller, C.O., Skoog, F.K., Saltza, M.H., Strong, F.M. (1955). Kinetin, a division factor from deoxyribonucleic acid. *J. Am. Chem. Soc.* 77: 1392-1392. <https://doi.org/10.1021/ja01610a105>
- Miyawaki, K., Matsumoto-Kitano, M., Kakimoto, T. (2004). Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in *Arabidopsis*: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate. *Plant J.* 37: 128-138. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01945.x>
- Miyawaki, K., Tarkowski, P., Matsumoto-Kitano, M., Kato, T., Sato, S., Tarkowska, D., Tabata, S., Sandberg, G., Kakimoto, T. (2006). Roles of *Arabidopsis* ATP/ADP isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103(44): 16598-603. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603522103>
- Nguyen, H.N., Lai, N., Kisiala, A.B., Emery, R.N. (2021). Isopentenyltransferases as master regulators of crop performance: their function, manipulation, and genetic potential for stress adaptation and yield improvement. *Plant Biotechnol. J.* 19(7): 1297-1313. <https://doi.org/10.1111%2Fpbi.13603>
- Nguyen, H.N., Perry, L., Kisiala, A., Olechowski, H., Emery, R.N. (2020). Cytokinin activity during early kernel development corresponds positively with yield potential and later stage ABA accumulation in field-grown wheat (*Triticum aestivum* L.). *Planta.* 252(5): 76. <https://doi.org/10.1007/s00425-020-03483-2>
- Osugi, A., Kojima, M., Takebayashi, Y., Ueda, N., Kiba, T., Sakakibara, H. (2017). Systemic transport of *trans*-zeatin and its precursor have differing roles in *Arabidopsis* shoots. *Nat. Plants.* 3: 17112. <https://doi.org/10.1038/nplants.2017.112>
- Pavlů, J., Novák, J., Koukalová, V., Luklová, M., Brzobohatý, B., Černý, M. (2018). Cytokinin at the crossroads of abiotic stress signalling pathways. *Int. J. Mol. Sci.* 19(8): 2450. <https://doi.org/10.3390/ijms19082450>

- Peleg, Z., Reguera, M., Tumimbang, E., Walia, H., Blumwald, E. (2011). Cytokinin-mediated source/sink modifications improve drought tolerance and increase grain yield in rice under water-stress. *Plant Biotechnol. J.* 9(7): 747-58. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2010.00584.x>
- Powell, A.F., Paleczny, A.R., Olechowski, H., Emery, R.N. (2013). Changes in cytokinin form and concentration in developing kernels correspond with variation in yield among field-grown barley cultivars. *Plant Physiol. Biochem.* 201364: 33-40. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.12.010>
- Ptošková, K., Szcwółka, M., Jaworek, P., Tarkowska, D., Petřík, I., Pavlović, I., Novák, O., Thomas, S. G., Phillips, A. L., Hedden, P. (2022). Changes in the concentrations and transcripts for gibberellins and other hormones in a growing leaf and roots of wheat seedlings in response to water restriction. *BMC Plant Biol.* 22(1): 284. <https://doi.org/10.1186/s12870-022-03667-w>
- Ramireddy, E., Hosseini, S.A., Eggert, K., Gilland, S., Gnad, H., von Wirén, N., Schmülling, T. (2018). Root engineering in barley: increasing cytokinin degradation produces a larger root system, mineral enrichment in the shoot and improved drought tolerance. *Plant Physiol.* 177(3): 1078-1095. <https://doi.org/10.1104/pp.18.00199>
- Reguera, M., Peleg, Z., Abdel-Tawab, Y.M., Tumimbang, E.B., Delatorre, C.A., Blumwald, E. (2013). Stress-induced cytokinin synthesis increases drought tolerance through the coordinated regulation of carbon and nitrogen assimilation in rice. *Plant Physiol.* 163(4): 1609-1622. <https://doi.org/10.1104/pp.113.227702>
- Rijavec, T., Kovac, M., Kladnik, A., Chourey, P.S., Dermastia, M.A. (2009). Comparative study on the role of cytokinins in caryopsis development in the maize miniature seed mutant and its wild type. *J. Integr. Plant Biol.* 51: 840-849. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2009.00863.x>
- Rivero, R.M., Kojima, M., Gepstein, A., Sakakibara, H., Mittler, R., Gepstein, S., Blumwald, E. (2007). Delayed leaf senescence induces extreme drought tolerance in a flowering plant. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104(49): 19631-19636. <https://doi.org/10.1073/pnas.0709453104>
- Romanov, G. A., Schmülling, T. (2021). On the biological activity of cytokinin free bases and their ribosides. *Planta.* 255(1): 27. <https://doi.org/10.1007/s00425-021-03810-1>
- Sakakibara, H. (2021). Cytokinin biosynthesis and transport for systemic nitrogen signaling. *Plant J.* 105: 421-430. <https://doi.org/10.1111/tpj.15011>
- Sakamoto, T., Sakakibara H., Kojima M., Yamamoto Y., Nagasaki H., Inukai Y., Sato Y., Matsuoka M. (2006). Ectopic expression of *KNOTTED1-like* homeobox protein induces expression of cytokinin biosynthesis genes in rice. *Transgenic Res. Plant Physiol.* 142: 54-62. <https://doi.org/10.1104/pp.106.085811>
- Schäfer, M., Brütting, C., Meza-Canales, I.D., Großkinsky, D.K., Vankova, R., Baldwin, I.T., Meldau, S. (2015). The role of *cis*-zeatin-type cytokinins in plant growth regulation and mediating responses to environmental interactions. *J. Exp. Bot.* 66(16): 4873-4884. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv214>
- Shoib, M., Yang, W., Shan, Q., Sajjad, M., Zhang, A. (2019). Genome-wide identification and expression analysis of new cytokinin metabolic genes in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *PeerJ.* 7: e6300. <https://doi.org/10.7717/peerj.6300>
- Song, J., Jiang, L., Jameson, P.E. (2012). Co-ordinate regulation of cytokinin gene family members during flag leaf and reproductive development in wheat. *BMC Plant Biol.* 12: 78. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-78>
- Song, Y., Li, C., Zhu, Y., Guo, P., Wang, Q., Zhang, L., Wang, Z., Di, H. (2022). Overexpression of *ZmIPT2* gene delays leaf senescence and improves grain yield in maize. *Front. Plant Sci.* 13: 963873. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.963873>
- Spichal, L., Rakova, N.Y., Riefler, M., Mizuno, T., Romanov, G.A., Strnad, M., Schmülling, T. (2004). Two cytokinin receptors of *Arabidopsis thaliana*, *CRE1/AHK4* and *AHK3*, differ in their ligand specificity in a bacterial assay. *Plant Cell Physiol.* 45: 1299-1305. <https://doi.org/10.1093/pcp/pch132>
- Stolz, A., Riefler, M., Lomin, S.N., Achazi, K., Romanov, G.A., Schmülling, T. (2011). The specificity of cytokinin signalling in *Arabidopsis thaliana* is mediated by differing ligand affinities and expression profiles of the receptors. *Plant J.* 67: 157-168. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2011.04584.x>
- Takagi, M., Yokota, T., Murofushi, N., Saka, H., Takahashi, N. (1989). Quantitative changes of free-base, riboside, ribotide and glucoside cytokinins in developing rice grains. *Plant Growth Regul.* 8: 349-364. <https://doi.org/10.1007/BF00024665>
- Takei, K., Yamaya, T., Sakakibara, H. (2004). *Arabidopsis CYP735A1* and *CYP735A2* encode cytokinin hydroxylases that catalyze the biosynthesis of *trans*-zeatin. *J. Biol. Chem.* 279(40): 41866-72. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M406337200>
- Terceros, G.C., Resentini, F., Cucinotta, M., Manrique, S., Colombo, L., Mendes, M. A. (2020). The Importance of cytokinins during reproductive development in *Arabidopsis* and beyond. *Int. J. Mol. Sci.* 21(21): 8161. <https://doi.org/10.3390/ijms21218161>
- Veselov, S. Y., Timergalina, L. N., Akhmyarova, G. R., Kudoyarova, G. R., Korobova, A. V., Ivanov, I., Arkhipova, T. N., Prinsen, E. (2018). Study of cytokinin transport from shoots to roots of wheat plants is informed by a novel method of differential localization of free cytokinin bases or their ribosylated forms by means of their specific fixation. *Protoplasma.* 255(5): 1581-1594. <https://doi.org/10.1007/s00709-018-1248-7>
- Wang, N., Chen, J., Gao, Y., Zhou, Y., Chen, M., Xu, Z., Fang, Z., Ma, Y. (2023). Genomic analysis of isopentenyltransferase genes and functional characterization of *TaIPT8* indicates positive effects of cytokinins on drought tolerance in wheat. *Crop J.* 11(1): 46-56. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2022.04.010>
- Wang, X., Lin, S., Liu, D., Gan, L., McAvoy, R., Ding, J., Li, Y. (2020). Evolution and roles of cytokinin genes in angiosperms: Do ancient *IPTs* play housekeeping while non-ancient *IPTs* play regulatory roles? *Horticult. Res.* 7: 1-15. <https://doi.org/10.1038/s41438-019-0211-x>
- Werner, T., Nehnevajova, E., Köllmer, I., Novák, O., Strnad, M., Krämer, U., Schmülling, T. (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>
- Yang, J., Zhang, J., Huang, Z., Wang, Z., Zhu, Q., Liu, L. (2002). Correlation of cytokinin levels in the endosperms and roots with cell number and cell division activity during endosperm development in rice. *Ann. Bot.* 90(3): 369-377. <https://doi.org/10.1093/aob/mcf198>

- Yonekura-Sakakibara, K., Kojima, M., Yamaya, T., Sakakibara, H. (2004). Molecular characterization of cytokinin-responsive histidine kinases in maize. Differential ligand preferences and response to *cis*-zeatin. *Plant Physiol.* 134: 1654–1661. <https://doi.org/10.1104/pp.103.037176>
- Yu, Y., Zhu, D., Ma, C., Cao, H., Wang, Y., Xu, Y., Zhang, W., Wen, Z. (2016). Transcriptome analysis reveals key differentially expressed genes involved in wheat grain development. *Crop J.* 4(2): 92-106. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2016.01.006>
- Zalewski, W., Galuszka, P., Gasparis, S., Orczyk, W., Nadolska-Orczyk, A. (2010). Silencing of the *HvCKX1* gene decreases the cytokinin oxidase/dehydrogenase level in barley and leads to higher plant productivity. *J. Exp. Bot.* 61(6): 1839–1851. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq052>
- Zalewski, W., Gasparis, S., Boczkowska, M., Rajchel, I. K., Kała, M., Orczyk, W., Nadolska-Orczyk, A. (2014). Expression patterns of *HvCKX* genes indicate their role in growth and reproductive development of barley. *PLoS One.* 9(12): e115729. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115729>
- Zalewski, W., Orczyk, W., Gasparis, S., Nadolska-Orczyk, A. (2012). *HvCKX2* gene silencing by biolistic or *Agrobacterium*-mediated transformation in barley leads to different phenotypes. *BMC Plant Biol.* 12: 206. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-206>
- Zhang, L., Zhao, Y.L., Gao, L.F., Zhao, G.Y., Zhou, R.H., Zhang, B.S., Jia, J.Z. (2012). *TaCKX6-D1* the ortholog of rice *OsCKX2*, is associated with grain weight in hexaploid wheat. *New Phytol.* 195(3): 574–584. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04194.x>