



Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin  
– Państwowy Instytut Badawczy

Bartosz Jabłoński

Autoreferat rozprawy doktorskiej pt.:

**Rola wybranych genów *TaCKX* w regulacji rozwoju  
i produktywności pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.)**

Role of selected *TaCKX* genes in regulation of development and productivity of  
common wheat (*Triticum aestivum* L.)

Praca wykonana w Zakładzie Genomiki Funkcjonalnej

**Promotor:** prof. dr hab. Anna Nadolska-Orczyk

**Promotor pomocniczy:** dr inż. Sebastian Gasparis

**Recenzenci:**

Dr hab. Agnieszka Janiak, prof. UŚ

Uniwersytet Śląski w Katowicach,

Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska

Prof. dr hab. Tomasz Pniewski

Instytut Genetyki Roślin PAN w Poznaniu

Radzików, 2023

Badania finansowane w ramach:

Projekt Narodowego Centrum Nauki OPUS 7, nr UMO-2014/13/B/NZ9/02376

Rola genów *TaCKX* w regulacji procesów rozwoju roślin pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.)

Kierownik projektu, prof. dr hab. Anna Nadolska-Orczyk

Projekt Narodowego Centrum Nauki OPUS 19, nr UMO-2020/37/B/NZ9/00744

Ideotyp wysokoplonującej rośliny pszenicy bazujący na genetycznej regulacji cytokinin.

Kierownik projektu, prof. dr hab. Anna Nadolska-Orczyk

## Wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską

1. **B. Jabłoński**, H. Ogonowska, K. Szala, A. Bajguz, W. Orczyk, A. Nadolska-Orczyk. Silencing of *TaCKX1* mediates expression of other *TaCKX* genes to increase yield parameters in wheat.  
International Journal of Molecular Sciences 21(13) (2020) 4809  
doi:10.3390/ijms21134809  
IF<sub>2020</sub>: 5,924
2. **B. Jabłoński**, K. Szala, M. Przyborowski, A. Bajguz, M. Chmur, S. Gasparis, W. Orczyk, A. Nadolska-Orczyk.  
*TaCKX2.2* genes coordinate expression of other *TaCKX* family members, regulate phytohormone content and yield-related traits of wheat.  
International Journal of Molecular Sciences 22(8) (2021) 4142  
doi.org/10.3390/ijms22084142  
IF<sub>2021</sub>: 6,208
3. **B. Jabłoński**, A. Bajguz, J. Bocian, W. Orczyk, A. Nadolska-Orczyk.  
Genotype-dependent effect of silencing of *TaCKX1* and *TaCKX2* on phytohormone crosstalk and yield-related traits in wheat.  
International Journal of Molecular Sciences 22(21) (2021) 11494  
doi.org/10.3390/ijms222111494  
IF<sub>2021</sub>: 6,208

Sumaryczny IF: 18,34

## Streszczenie

Rodzina genów *TaCKX* (oksydaza/dehydrogenaza cytokininowa) odgrywa zasadniczą rolę w metabolizmie cytokinin podczas rozwoju pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.), wpływając tym samym w znaczący sposób na cechy plonotwórcze. Głównym celem pracy była szczegółowa analiza biologicznej funkcji wyżej wymienionych genów za pomocą technologii opartej na interferencji RNA (RNAi). Hipoteza badawcza zakładała, że wyciszenie ekspresji poszczególnych genów w danych tkankach i organach, na określonym etapie rozwoju, będzie determinować zmiany molekularne, fizjologiczne i fenotypowe u badanych roślin. W celu weryfikacji hipotezy uzyskano linie pszenicy dwóch odmian, bezostnej Kontesa i ościstej Ostka Smolicka z wyciszonym genem *TaCKX1* oraz trzema jednocześnie z grupy *TaCKX2* (*TaCKX2.1*, *TaCKX2.2.1* i *TaCKX2.2.2*) w pokoleniach generatywnych T<sub>0</sub>, T<sub>1</sub> i T<sub>2</sub>. W liniach pokoleń T<sub>1</sub> i T<sub>2</sub> przeprowadzono analizę ekspresji wyciszanych genów *TaCKX*, innych genów z tej rodziny i genu *TaNAC2-5A*. Ponadto wykonano pomiary aktywności enzymu CKX w kłosach 7 dni po zapylaniu (DAP) oraz charakterystykę cech morfologicznych, a w T<sub>2</sub> dodatkowo pomiary zawartości fitohormonów. Porównano efekt wyciszenia obu genów na ekspresję pozostałych genów z rodziny *TaCKX* w dwóch odmianach pszenicy różniących się m.in. obecnością ości w kłosach. W odmianie bezostnej Kontesa, z silnie wyciszonym *TaCKX1* w pokoleniu T<sub>2</sub> zaobserwowano znaczne obniżenie ekspresji *TaCKX11*, wzrost ekspresji *TaCKX2.1*, podwyższenie zawartości większości cytokinin rozkładanych przez enzym CKX oraz wzrost plonu (fenotyp o wyższej liczbie kłosów, ziaren i wyższym plonie ziaren, ale niższej masie tysiąca ziaren). Wyciszenie genów z grupy *TaCKX2* w tej samej odmianie wiązało się z wyciszeniem trzech genów, posiadających ponad 90% identyczności sekwencji kodujących: *TaCKX2.1*, *TaCKX2.2.1* i *TaCKX2.2.2*. Silnemu wyciszeniu genu *TaCKX2.2.2* w T<sub>2</sub> towarzyszyło nieznaczne obniżenie ekspresji *TaCKX2.2.1* i silny wzrost ekspresji *TaCKX5* i *TaCKX11* oraz podwyższenie poziomu aktywnych cytokinin, ich koniugatów i auksyny, tj. kwasu indolilo-3-octowego (IAA) przy jednoczesnym obniżeniu zawartości benzyloadeniny (BA), kwasu abscysynowego (ABA) i redukcji kwasu giberelinowego (GA<sub>3</sub>). W przypadku odmiany ościstej Ostka Smolicka, udokumentowano mechanizm sprzężenia zwrotnego regulacji ekspresji, w którym wyciszenie *TaCKX1* warunkowało wzrost ekspresji genów *TaCKX2* i na odwrót. Ponadto obniżenie ekspresji *TaCKX2* (głównie *TaCKX2.2.1* i *TaCKX2.2.2*) wpływało na silny wzrost ekspresji *TaCKX5*, *TaCKX1* i *TaNAC2-5A*, natomiast poziom ekspresji tych genów w roślinach z wyciszonym *TaCKX1* był obniżony. Wyciszone linie *TaCKX1* z pokolenia T<sub>2</sub> z obniżoną o około 50% ekspresją tego genu miały istotnie wyższą masę tysiąca ziaren (MTZ) i masę korzeni siewek. Wyciszone linie *TaCKX2* z pokolenia T<sub>2</sub> z poziomem ekspresji *TaCKX2.2.1* i *TaCKX2.2.2* obniżonym o ok. 30% miały znacznie wyższą zawartość chlorofilu w liściach flagowych. Dodatkowo zaobserwowano wpływ transformacji z użyciem *Agrobacterium* na badane cechy. Udokumentowano, że główne mechanizmy regulacji ekspresji genów z rodziny *TaCKX* były podobne w różnych odmianach pszenicy jarej, ale w zależności od zawartości i składu fitohormonów w różny sposób wpływały na regulację cech związanych z plonem.

## Wprowadzenie

Pszenica zwyczajna (*Triticum aestivum* L.) jest jednym z najważniejszych gatunków roślin uprawnych. Obok ryżu i kukurydzy jest zbożem o największej powierzchni upraw na świecie i drugim po kukurydzy pod względem światowej produkcji, wynoszącej blisko 770 mln ton w 2021 roku (<http://faostat.fao.org/>) oraz posiada bardzo duży zasięg geograficzny upraw (Shewry, 2009). Pszenica będąc alloheksaploidem charakteryzuje się bardzo dużym i złożonym genomem, który stanowi utrudnienie w selekcji pożądaných cech podczas hodowli oraz w wprowadzaniu zmian za pomocą inżynierii genetycznej.

Cytokininy są regulatorami wzrostu i rozwoju roślin, wpływającymi na wiele ważnych cech o znaczeniu rolniczym (Kieber i Schaller, 2018). Regulacja ta może wystąpić na poziomie potranskrypcyjnym i/lub potranslacyjnym (Kim i in., 2012, Černý i in., 2010). Cytokininy modulują ekspresję innych genów biorących udział w kontroli różnych procesów życiowych, w tym aktywności merystemów, metabolizmu innych fitohormonów, pozyskiwania składników odżywczych i reakcji na stres (Brenner i in., 2012). W zbożach i trawach zwiększona zawartość cytokinin ma pozytywny wpływ na potencjał przyjmowania asymilatów w rozwijających się ziarnach (Liu i in., 2013) oraz utrzymywanie zawartości chlorofilu w liściach podczas starzenia się roślin (Zhang i in., 2016) i wypełniania ziaren (Panda i in., 2018). Fitohormony te są uważane za kluczowy czynnik odpowiadający za plonowanie wielu gatunków roślin uprawnych, w tym zbóż (Jameson i Song, 2015). Homeostaza cytokinin jest przestrzennie i czasowo regulowana poprzez równowagę między procesami metabolizmu, czyli syntezy, degradacji, aktywacji i inaktywacji oraz transportu (Hirose i in., 2007). Proces nieodwracalnej degradacji cytokinin jest regulowany przez oksydazy/dehydrogenazy cytokininowe (CKX) kodowane przez geny *CKX*. Zmiany aktywności CKX prowadzą do zmian stężenia cytokinin w tkankach, dlatego enzym ten odgrywa kluczową rolę w regulacji zawartości cytokinin, a tym samym znacząco przyczynia się do regulacji różnych procesów fizjologicznych kontrolowanych przez jego izoenzymy (Avalbaev i in., 2012).

Geny z rodziny *TaCKX* wykazują specyficzne wzorce ekspresji dla tkanek i narządów, co sugeruje istnienie specyficznych funkcji tych genów (Song i in., 2012, Ogonowska i in., 2019). Tylko nieliczne geny z rodziny *TaCKX* były poddane analizie funkcjonalnej (Lu i in., 2015, Zhang i in., 2012, Chang i in., 2016, Li i in., 2018). W niniejszych badaniach podjęto próbę charakterystyki funkcji genu *TaCKX1* oraz genów z grupy *TaCKX2* w dwóch odmianach pszenicy z wykorzystaniem modyfikowanych linii uzyskanych za pomocą technologii RNAi.

## Hipoteza badawcza i cele prowadzonych badań

Celem pracy była analiza funkcji biologicznej genu *TaCKX1* oraz genów z grupy *TaCKX2* w dwóch odmianach pszenicy zwyczajnej z wykorzystaniem linii zmodyfikowanych genetycznie za pomocą technologii RNAi. Cele szczegółowe pracy to:

- określenie poziomu ekspresji genów wyciszanych oraz ich koekspresję z innymi genami z rodziny *TaCKX*,
- scharakteryzowanie zawartości fitohormonów ze szczególnym uwzględnieniem cytokinin oraz analiza aktywności enzymu oksydazy/dehydrogenazy cytokininy w transformowanych i kontrolnych liniach pszenicy,
- ocena wpływu zmian w poziomach ekspresji *TaCKX*, enzymu CKX i fitohormonów na cechy plonotwórcze roślin.

Hipoteza badawcza stanowi, że linie pszenicy zawierające kasety RNAi ukierunkowane na wyciszenie genów *TaCKX1* i *TaCKX2* (*TaCKX2.1*, *TaCKX2.2.1* i *TaCKX2.2.2*) będą wykazywać zmiany na poziomie molekularnym, fizjologicznym i morfologicznym, co umożliwi przeprowadzenie szczegółowej analizy ich funkcji biologicznej.

Badania przeprowadzono na kłosach 7 dni po zapylaniu, zebranych z linii transgenicznych dwóch odmian roślin pszenicy w pokoleniach T<sub>1</sub> i T<sub>2</sub>

## Materialy i metody

Do badań przeprowadzonych w ramach pracy doktorskiej wykorzystano dwie odmiany pszenicy jarej, Kontesa i Ostka Smolicka, z wprowadzonymi kasetami wyciszającymi gen *TaCKX1* i trzy geny *TaCKX2* (*TaCKX2.1*, *TaCKX2.2.1* i *TaCKX2.2.2*) osobno dla każdej z odmian. Rośliny uprawiane były w kontrolowanych warunkach natomiast tkanką do analiz były kłosa pobierane w siódmym dniu po zapylaniu (7 DAP).

Zastosowane w pracy metody obejmowały pomiary morfometryczne 5-cio dniowych siewek oraz dojrzałych roślin (wysokość roślin, długość kłosa, liczba kłosów na roślinę, liczba ziaren na roślinę, masa ziaren na roślinę, masa tysiąca ziaren) oraz pomiar zawartości chlorofilu miernikiem SPAD, ekstrakcję DNA, RNA, syntezę cDNA, testy PCR, ilościowy RT-qPCR, pomiar aktywności enzymatycznej, chromatograficzne oznaczanie fitohormonów oraz analizy statystyczne. Pomiary fitohormonów zostały wykonane przez zespół prof. dr hab. Andrzeja Bajguza z Zakładu Biochemii Roślin i Toksykologii Instytutu Biologii Uniwersytetu w Białymstoku.

## Wyniki badań wg publikacji

### 1. Wyciszenie *TaCKX1* zmienia profil ekspresji innych genów z rodziny *TaCKX* oraz determinuje wzrost parametrów plonowania pszenicy (Jabłoński i in., 2020)

Zgodnie z wcześniejszymi badaniami zespołu gen *TaCKX1* ulega bardzo silnej, specyficznej ekspresji w rozwijających się kłosach i niższej w korzeniach siewek (Ogonowska i in., 2019). Założono, że obniżenie ekspresji tego genu powinno wpłynąć na obniżenie aktywności kodowanego przez niego enzymu CKX i tym samym na zwiększenie zawartości cytokinin wskutek zahamowania ich degradacji. Ze względu na wysoką ekspresję genu

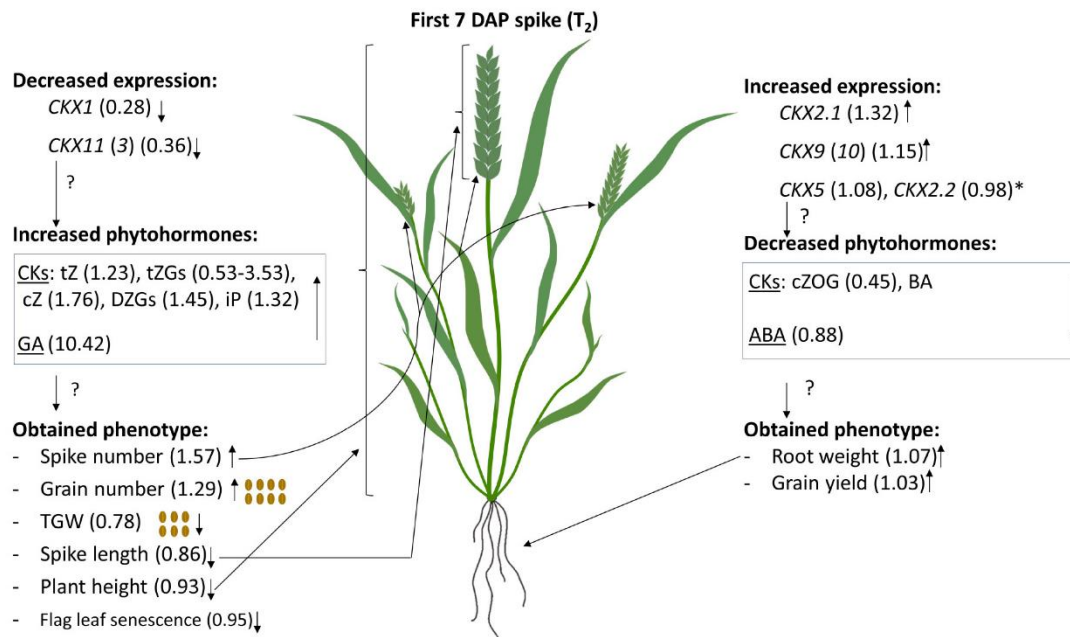
*TaCKX1* w rozwijających się kłosach i korzeniach siewek, był on jako pierwszy wybrany do analizy jego roli w rozwoju roślin i wpływu na cechy plonotwórcze pszenicy. Gen ten został wyciszony przy użyciu wektora typu RNAi z wykorzystaniem transformacji za pomocą *Agrobacterium tumefaciens*. Kasetę wyciszającą zawierała 378 par zasad sekwencji kodującej *TaCKX1* (NCBI JN128583). Uzyskano transgeniczne rośliny, wśród których wyselekcjonowano wyciszone linie w pokoleniu T<sub>1</sub> oraz T<sub>2</sub>. Poziom wyciszania badany był w kłosach 7 DAP a jego wpływ na cechy morfologiczne w dojrzałych roślinach oraz w korzeniach siewek. Ponadto oceniono udział *TaCKX1* w regulacji ekspresji innych genów z rodziny *TaCKX* i wpływ wyciszenia tego genu na zawartość fitohormonów. Badaniami koregulacji ekspresji w kłosach 7 DAP objęto geny *TaCKX2.2*, *TaCKX2.1*, *TaCKX5*, *TaCKX9* i *TaCKX11*. W tym samym organie dokonywano pomiarów zawartości następujących fitohormonów: cytokinin, jak *trans*-i *cis*-zeatyna, dihydrozeatyna (DZ), N<sup>6</sup>-izopentenyloadenina (iP), BA; wybranych auksyn jak IAA, kwas indolilo-3-masłowy (IBA), kwas indolilo-3-propionowy (IPA), kwas naftylo-1-octowy (NAA), kwas fenylooctowy (PAA); kwasu giberelinowego (GA) i kwasu abscysynowego (ABA).

Stwierdzono wystąpienie zróżnicowanego poziomu wyciszania *TaCKX1* w ramach jednego pokolenia oraz między pokoleniami T<sub>1</sub> i T<sub>2</sub>. Był on powiązany ze zróżnicowanym wzorem ekspresji pozostałych genów z rodziny *TaCKX* oraz odmiennym fenotypem roślin. Poziom względnej ekspresji *TaCKX1* w T<sub>1</sub> wynosił średnio 0,67 w grupie 14 wyciszonych roślin (względem kontroli = 1,0) co odpowiada wyciszeniu na poziomie 33% oraz 1,16 w grupie 30 roślin kontrolnych, niewyciszonych. Liczba kłosów, liczba ziaren i plon w roślinach wyciszonych T<sub>1</sub> w stosunku do kontroli uległy obniżeniu. W pokoleniu T<sub>2</sub> średnia ekspresja *TaCKX1* spadła znacznie: wśród 8 najsilniej wyciszonych roślin względna ekspresja wyniosła 0,28 (wyciszenie na poziomie 72%). Wysoki, 72% poziom wyciszenia wiązał się z wyższą, średnią liczbą kłosów i liczbą ziaren w roślinach. Silne obniżenie ekspresji *TaCKX1* w T<sub>2</sub> było powiązane z silnym obniżeniem, rzędu 64% ekspresji *TaCKX11* oraz niewielkim podwyższeniem ekspresji *TaCKX2.1* i 9 jak i istotnym wzrostem wymienionych powyżej cech plonotwórczych, tj. średnią liczbą kłosów, liczbą ziaren, plonem ziaren i masą korzeni siewek oraz spadkiem MTZ. Ponadto zaobserwowano silną, dodatnią korelację pomiędzy *TaCKX9* a *TaCKX2.1*.

W wyniku pomiaru fitohormonów stwierdzono, że główną grupą cytokinin w kłosach 7 DAP jest *trans*-zeatyna oraz *cis*-zeatyna i ich pochodne. Poziom tych aktywnych form cytokinin w T<sub>2</sub> był większy o 23% i 76% w grupie roślin wyciszonych w stosunku do niewyciszonych. Zawartość BA spadła o 73%. Podwyższenie poziomu aktywnych form cytokinin i obniżenie ich form nieaktywnych oraz BA w roślinach wyciszonych było związane z 10-krotnym wzrostem zawartości GA<sub>3</sub>. Zawartość ABA i IAA pozostały na poziomie zbliżonym do kontroli (wartości względne wynosiły odpowiednio 0,88 i 1,04).

Zaprezentowano skoordynowany efekt wyciszenia *TaCKX1* na ekspresję pozostałych genów *TaCKX*, poziom fitohormonów i wartości cech plonotwórczych w wyciszonych liniach T<sub>2</sub> (Rys. 1). Ponadto przeanalizowano korelacje między badanymi cechami. Cecha wysokości roślin w kontroli korelowała negatywnie z zawartością BA i pozytywnie z zawartością IAA i GA<sub>3</sub> w kłosach 7 DAP, co mogło skutkować zwiększonym wzrostem roślin. Długość kłosów była pozytywnie skorelowana z wyższą zawartością *cis*-zeatyny-*O*-glukozydu (cZOG) oraz negatywnie z ABA w roślinach niewyciszonych. Natomiast w roślinach wyciszonych cecha ta była pozytywnie skorelowana ze wzrostem ekspresji *TaCKX2.2* oraz *TaCKX5*. Przeciwna regulacja ekspresji genów *TaCKX2.1* i *TaCKX11*, których ekspresja odpowiednio wzrasta i maleje, może wpływać na utrzymanie aktywności enzymu CKX na tym samym poziomie, tym samym regulując MTZ w roślinach wyciszonych. Plon ziaren był silnie pozytywnie skorelowany z liczbą ziaren i kłosów w roślinach kontrolnych, niewyciszonych oraz pozytywnie z MTZ w roślinach wyciszonych. Masa korzeni była dodatkowo skorelowana z niższą

ekspresją *TaCKX9* w kłosach 7 DAP roślin niewyciszonych oraz ujemnie ze zwiększoną ekspresją tego genu w roślinach wyciszonych. Można przypuszczać, że wyższa zawartość aktywnych cytokinin oraz  $GA_3$  w kłosach 7 DAP roślin wyciszonych powoduje obniżenie poziomu cytokinin w liściach flagowych, przyspieszając ich starzenie. Natomiast wolniejsze dojrzewanie kłosa w roślinach niewyciszonych, które może być zależne od niższej zawartości cytokinin w kłosie 7 DAP, może powodować wolniejszy przepływ mikroelementów oraz cytokinin z liścia flagowego do kłosa, czego efektem była wyższa MTZ.



Rys. 1. Prezentacja graficzna skoordynowanego efektu wyciszenia genu *TaCKX1* w kłosach 7 DAP roślin  $T_2$  na ekspresję innych genów *TaCKX*, poziomy fitohormonów oraz morfologię roślin. ? –oczekiwane zmiany.

Udokumentowaliśmy, że różne poziomy wyciszenia genu *TaCKX1* wpływają na wystąpienie różnych modeli koekspresji z innymi genami *TaCKX* oraz parametry cech plonotwórczych. Poszczególne geny *TaCKX* wspólnie regulują zawartość aktywnych cytokinin w wyciszonych roślinach. Zmiany zawartości cytokinin wpływały na pozostałe badane przez nas fitohormony: auksyny,  $GA_3$ , ABA. Podsumowując wzór ekspresji genów z rodziny *TaCKX* w skoordynowany sposób wpływał na zawartość cytokinin, innych fitohormonów oraz cech plonotwórczych pszenicy.

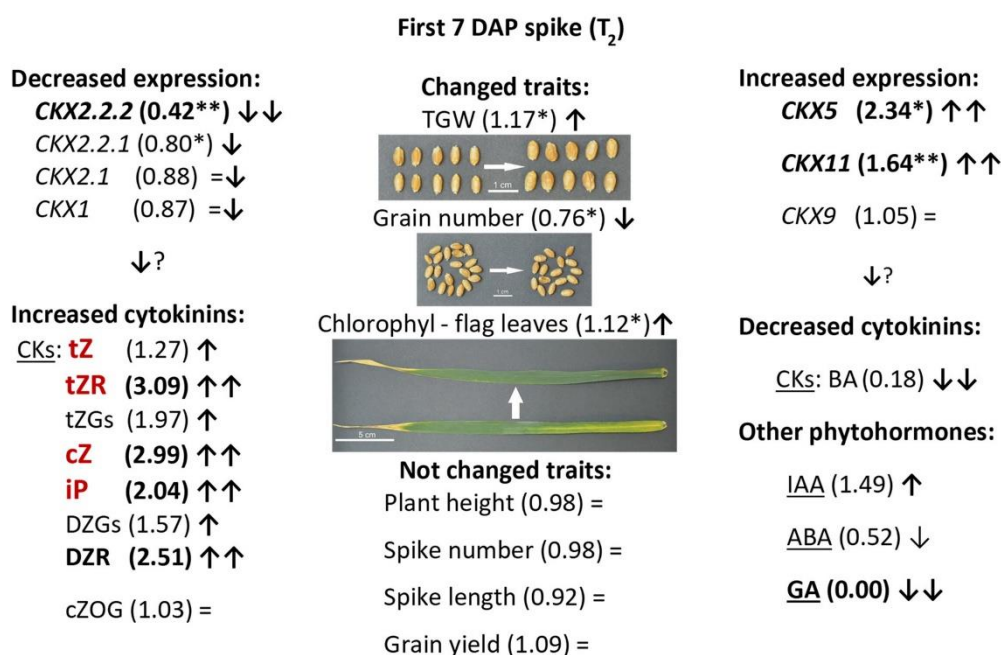
## 2. Jak geny *TaCKX2.2* koordynują ekspresję innych genów z rodziny *TaCKX*, regulują zawartość fitohormonów i determinują cechy pszenicy związane z plonem (Jablonski i in., 2021b)

Celem tej pracy była analiza funkcji genów *TaCKX2* (*TaCKX2.1*, *TaCKX2.2.1* i *TaCKX2.2.2*). Ze względu na ich dużą homologię użyty fragment sekwencji kodującej genu *TaCKX2.2.2-3D* o długości 385 par zasad, umożliwił wyciszanie wszystkich trzech genów *TaCKX2* i ich homeologów. Ten fragment posiada 93% – 94,3% podobieństwa z odpowiadającym fragmentem genu *TaCKX2.2.1* oraz 87,9% – 92,3% podobieństwa z *TaCKX2.1*. Wszystkie fragmenty znajdują się na chromosomach 3A, 3B i 3D. Fragment wyciszający wprowadzono do roślin za pomocą transformacji *Agrobacterium tumefaciens*. Materiałem roślinnym w tych badaniach, podobnie jak w poprzednich, była odmiana pszenicy jarej Kontesa. Badano poziom wyciszania ekspresji genów *TaCKX2.2* w kolejnych pokoleniach generatywnych  $T_1$  i  $T_2$  wyprowadzonych linii oraz na tej podstawie prowadzono selekcję najsilniej wyciszonych. Analizowano koekspresje genów *TaCKX2.2* z innymi wybranymi



genami z rodziny *TaCKX* (*TaCKX1*, 5, 9 i 11) oraz ich udział w regulacji zawartości fitohormonów i cech plonotwórczych.

Poziomy wyciszenia trzech genów *TaCKX2* były różne w poszczególnych pokoleniach generatywnych, co skutkowało odmiennymi fenotypami. W pokoleniu T<sub>1</sub> wyciszone linie podzielono na dwie grupy w zależności od poziomu wyciszenia jednego z genów *TaCKX2*. W pierwszej grupie względna ekspresja genu *TaCKX2.2.2* wynosiła średnio 0,68 a parametry fenotypowe uległy niewielkiemu, nieistotnemu statystycznie obniżeniu względem kontroli. Natomiast w drugiej grupie roślin z najsilniej wyciszonym *TaCKX2.2.1* (średnia ekspresja względna wyniosła 0,65), rośliny były istotnie wyższe a pozostałe cechy (długość kłosa, liczba nasion, masa nasion i MTZ) były nieznacznie podwyższone względem kontroli. Te różnice mogą wskazywać na różne funkcje tych dwóch genów. Efekt wyciszania genów *TaCKX2* na ekspresję pozostałych genów *TaCKX*, poziom fitohormonów i wartości cech plonotwórczych w wyciszonych liniach T<sub>2</sub> przedstawiono na Rys. 2.



Rys. 2. Schematyczne przedstawienie wzrostu (↑) lub obniżenia (↓) ekspresji genów *TaCKX*, zawartości fitohormonów i cech związanych z plonem w kłosach 7 DAP linii wyciszonych T<sub>2</sub>. W nawiasach podano wartości względem kontroli = 1,00. Wartości znacznie obniżone (↓↓) lub mocno podwyższone (↑↑) są pogrubione. \* — istotne przy  $p \leq 0,05$ ; \*\* — istotne przy  $p \leq 0,01$ . Cytokininy zaznaczone na czerwono to substraty dla enzymu CKX. = — nie zmienione; ? — oczekiwane rezultaty.

W grupie mocno wyciszonych linii pokolenia T<sub>2</sub> poziom ekspresji *TaCKX2.2.1* wzrósł do 0,80, a *TaCKX2.2.2* spadł do 0,42. Podobnie jak w T<sub>1</sub>, również w T<sub>2</sub> wysokość roślin, produktywność, liczba kłosów i długość kłosów okazała się być podobna do kontroli. Natomiast MTZ i zawartość chlorofilu w liściach flagowych (mierzona aparatem SPAD) miały wartości statystycznie istotnie wyższe a liczba ziaren była istotnie niższa od kontroli.

Silny spadek ekspresji *TaCKX2.2.2* rzędu 58% w kłosach 7 DAP pokolenia T<sub>2</sub> wpłynął również na ekspresję innych genów *TaCKX* oraz poziom fitohormonów. Był on związany z niewielkim obniżeniem ekspresji *TaCKX2.2.1* przy jednoczesnym znacznym wzroście ekspresji *TaCKX5* i *TaCKX11* (odpowiednio do 234% i 164%). Nastąpił niewielki spadek ekspresji *TaCKX2.1* i *TaCKX1*. W wyciszonych liniach *TaCKX2.2.2* obserwowano wzrost zawartości większości cytokinin w kłosach 7 DAP w tym form aktywnych: *trans*-zeatyny (tZ), rybozydu *trans*-zeatyny (tZR), *cis*-zeatyny (cZ), rybozydu dihydrozeatyny (DZR) i iP jak i

nieaktywnych glukozydów *trans*-zeatyny (tZGs), glukozydów dihydrozeatyny (DZGs). Najwyższy, ponad trzykrotny wzrost odnotowano dla tZR i cZ oraz ponad dwukrotny dla iP i DZR. Te formy cytokinin, poza ostatnią, są degradowane przez enzym CKX w związku z tym obserwowana tendencja jest prawidłowa. Odnotowano również wzrost zawartości IAA i znaczny spadek BA, ABA a GA<sub>3</sub> nie był wykryty. Odnotowane zmiany cech plonotwórczych to istotny, 17% wzrost MTZ, istotny spadek liczby nasion o 24%, istotny wzrost zawartości chlorofilu w liściu flagowym o 12%; pozostałe cechy morfologiczne nie uległy zmianom. Aktywność enzymu CKX w T<sub>2</sub> spadła nieznacznie (o 6%).

Silne, ponad 58% wyciszenie ekspresji *TaCKX2.2.2* miało raczej pozytywny wpływ na cechy związane z plonem. Odnotowano istotny wzrost MTZ i mimo istotnego spadku liczby ziaren na roślinę, całkowita masy ziaren na roślinę była nieco wyższa niż w kontroli. Obserwowany wzrost względnej zawartości chlorofilu w liściach flagowych mógł przyczynić się do wydłużenia okresu fotosyntezy. Ponieważ z tych liści przekazywane są asymilaty do rozwoju ziaren, wydłużenie okresu fotosyntezy mogło skutkować wzrostem MTZ. Dodatkowo obniżenie zawartości ABA i brak GA<sub>3</sub> mogło wpłynąć na opóźnienie dojrzewania ziarniaków i pełniejsze wypełnienie ziaren.

Współczynniki korelacji potwierdziły negatywną korelację między ekspresją genów *TaCKX2.1* i *TaCKX2.2.2* u roślin z wyciszonym genem *TaCKX2.2.2* a MTZ i zawartością chlorofilu w liściach flagowych i odwrotnie, pozytywną korelację pomiędzy ekspresją *TaCKX2.2.2* i liczbą ziaren. Korelacje pomiędzy MTZ i zawartością cytokinin oraz ekspresją genów wskazują na bardziej skomplikowany wzór regulacji. Stwierdzono m.in. silną negatywną korelację ekspresji *TaCKX9* z tZR i *TaCKX2.1* z DZR. Negatywna korelacja ekspresji *TaCKX9* z tZR występowała również w przypadku cechy wysokości roślin oraz produktywności. W przypadku cechy zawartości chlorofilu współczynniki korelacji były jednoznacznie negatywne z zawartością BA, co było związane ze spadkiem ekspresji *TaCKX2.1* w powiązaniu ze spadkiem ekspresji *TaCKX2.2.2* oraz ze spadkiem zawartości ABA.

Podsumowując, silny spadek ekspresji *TaCKX2.2.2* przy równoczesnym wzroście ekspresji *TaCKX5* i *TaCKX11* skutkowało podwyższeniem zawartości wolnych cytokinin izoprenoidowych: cZ, tZ i iP, obniżeniem zawartości BA i ABA i zredukowaniem do zera GA<sub>3</sub> co pozytywnie wpłynęło na zawartość chlorofilu w liściach flagowych oraz wzrost MTZ przy jednoczesnej redukcji liczby ziaren.

### **3. Genotypowo-zależny wpływ wyciszenia *TaCKX1* i *TaCKX2* na regulację metabolizmu fitohormonów i cechy związane z plonowaniem pszenicy (Jablonski i in., 2021a)**

W niniejszej pracy przeprowadzono analizę funkcji genu *TaCKX1* i trzech genów *TaCKX2* (*TaCKX2.2.2*, *TaCKX2.2.1* i *TaCKX2.1*) w innej odmianie pszenicy jarej, Ostka Smolicka. Różniła się ona fenotypowo od użytej we wcześniejszych badaniach odmianie Kontesa obecnością ości w kłosie. Do wyciszenia użyto tych samych konstrukcji wektorowych i systemu *Agrobacterium* jak dla odmiany Kontesa. Podobnie jak w poprzednich badaniach sprawdzano wpływ wyciszenia badanych genów na koekspresję innych genów z rodziny *TaCKX* (*TaCKX11*, *TaCKX5* i *TaCKX9*), zawartość fitohormonów w kłosach 7 DAP i cechy plonotwórcze. Ponadto analizowano ekspresję *TaNAC2-5A*, kodującego jeden z ważnych czynników transkrypcyjnych z grupy NAC u pszenicy, odpowiadający za sygnalizację azotanową. Nadekspresja tego genu wiązała się ze zwiększeniem pozyskiwania azotu przez korzenie i jego akumulację w pędzie co miało pozytywny wpływ na plon (He i in., 2015).

Wyciszenie genu *TaCKX1* powodowało znaczny wzrost ekspresji genów *TaCKX2.2.1* i *TaCKX2.1*, natomiast wyciszenie genów *TaCKX2* wpłynęło na znaczne zwiększenie ekspresji

*TaCKX1*. Wystąpił więc silny mechanizm sprzężenia zwrotnego regulacji ekspresji tych genów, w którym efektem wyciszenia *TaCKX1* był silny wzrost ekspresji *TaCKX2* i odwrotnie. Dodatkowo obniżenie o około 50% ekspresji *TaCKX1* wiązało się z obniżeniem ekspresji *TaCKX11*, *TaCKX5* i *TaCKX9*, natomiast 30% wyciszenie obu genów *TaCKX2.2* było powiązane z wielokrotnym wzrostem ekspresji *TaCKX5* i dwukrotnym *TaNAC2-5A*. Może to wskazywać na niezależną regulację ekspresji *TaCKX1* i *TaCKX2* od pozostałych *TaCKX*. Obserwowane sprzężenie zwrotne poziomów ekspresji genów *TaCKX* prawdopodobnie przyczyniło się do utrzymania aktywności enzymu CKX na względnie stałym poziomie.

Różnice w poziomach ekspresji genów z rodziny *TaCKX* nie miały istotnego wpływu na zawartość fitohormonów w kłosach 7 DAP wyciszonych roślin. Interesującym jednak było zidentyfikowanie obecności w badanej odmianie Ostka Smolicka nowej, naturalnej auksyny, kwasu fenylooctowego i topolin, nie występujących w odmianie bezostnej w poprzednich badaniach. Ponadto nie wykryto w tej odmianie obecności GA<sub>3</sub> w badanych kłosach a zawartość kilku innych fitohormonów różniła się istotnie między odmianami (Jabłoński i in., 2020, Jablonski i in., 2021b). Sugerowaliśmy, że różnice w zawartości i profilach fitohormonów obydwu odmian mogą być związane z obecnością lub brakiem ości.

Obniżenie poziomu ekspresji *TaCKX1* o połowę w liniach wyciszonych Ostki Smolickiej skutkowało istotnym statystycznie wzrostem wartości MTZ, masy korzeni i nieistotnym statystycznie wzrostem parametrów liczby ziaren i produktywności. W liniach niewyciszonych poziom ekspresji tego genu był negatywnie skorelowany z wymienionymi cechami. Podobny efekt wyciszenia ortologicznego genu *HvCKX1* zaobserwowano w jęczmieniu (Zalewski i in., 2010). Natomiast efekt wyciszenia *TaCKX1* w odmianie Kontesa był odmienny niż w odmianie Ostka Smolicka. Wysoki poziom wyciszenia tego genu w T<sub>2</sub> skutkowało silnym obniżeniem ekspresji *TaCKX11* i podwyższeniem *TaCKX2.1* oraz wzrostem zawartości większości cytokinin w zakresie 23% do 76%, co wiązało się ze wzrostem liczby kłosów, liczby i masy ziaren, ale istotnym obniżeniem MTZ. Podsumowując, obniżenie ekspresji genów *TaCKX1* i *TaCKX2* w dwóch genotypach o kłosach ościstych i bezostnych miał różny wpływ na regulację metabolizmu fitohormonów oraz zmianę cech plonotwórczych. Efekt wyciszenia jest więc genotypowo-zależny.

Wyciszenie genów *TaCKX2* w pokoleniu T<sub>2</sub> odmiany Ostka Smolicka skutkowało obniżeniem ekspresji *TaCKX2.2.1* o 33% i obniżeniem ekspresji *TaCKX2.2.2* o 30% oraz prawie 9-cio krotnym wzrostem ekspresji *TaCKX5* i dwukrotnym *TaCKX1* oraz *TaNAC2-5A*. Zmiany w ekspresji były powiązane z prawie dwukrotnym wzrostem zawartości topolin, nieznacznym wzrostem zawartości aktywnych form cytokinin izoprenowych i BA oraz spadkiem produktów glikozylacji. Wyciszone linie wykazywały statystycznie istotną, wyższą zawartość chlorofilu w liściach flagowych, miały dłuższe kłosa oraz charakteryzowały się nieznacznym spadkiem liczby ziaren i produktywności. Wysokość roślin, liczba nasion, MTZ pozostały niezmiennione a nieistotnemu obniżeniu uległy liczba i masa nasion. Podobnie jak w przypadku wyciszenia genu *TaCKX1*, tak i w przypadku wyciszenia genów *TaCKX2* występowały różnice w efekcie wyciszenia pomiędzy odmianami. Wyciszenie genów *TaCKX2* w pokoleniu T<sub>2</sub> u odmiany Kontesa było związane głównie z wyciszeniem *TaCKX2.2.2*, którego ekspresja spadła o 58% oraz *TaCKX2.2.1* o ekspresji obniżonej tylko o 20%. Efektem tego był 2-3 krotny wzrost aktywnych form cytokinin, zwłaszcza tZR, cZ, iP, DZR, znaczny spadek BA i ABA oraz brak GA. Te zmiany prowadziły do istotnego wzrostu MTZ, spadku liczby ziaren i wzrostu zawartości chlorofilu w liściach, który był wspólny dla obydwu badanych genów. A więc w przypadku wyciszenia zarówno *TaCKX1* jak i *TaCKX2* u dwóch różnych odmian, regulacja cech plonotwórczych była zależna od wyciszanego genu i genotypu modyfikowanej rośliny. Schemat efektu wyciszenia genu *TaCKX1* i genów z grupy *TaCKX2* na regulację ekspresji innych genów, zawartości fitohormonów i kształtowanie cech plonotwórczych przedstawiono na Rys. 3.

**Decreased expression:**Silenced *CKX1* [0.53] ↓↓

CKX11 [0.65] ↓↓

CKX5 [0.67] ↓↓

CKX9 [0.75] ↓↓

NAC [0.92] =↓

↓?

**Increased cytokinins:**

DZR (2.56) ↑

tZ9G (1.37) ↑

tZOGR (1.30) ↑

DZOGR (1.20) ↑

cZ (1.10) ↑

tZ (1.09) =↑

tZR (0.98) =

**Decreased expression:**Silenced *CKX2.2.1* [0.67] ↓↓

CKX2.2.2 [0.70] ↓↓

CKX9 [0.81] ↓

CKX2.1 [0.94] =

↓?

**Increased cytokinins:**

o,m,pTs (1.77) ↑

DZR (1.37) ↑

iP7G (1.35) ↑

cZ (1.33) ↑

BA (1.33) ↑

iP (1.24) ↑

DZOGR (1.19) ↑

tZ (1.02) =

**Increased traits:****TGW (1.15) ↑↑****Root mass (1.26) ↑↑**

Grain yield (1.33) ↑

Grain number (1.19) ↑

Spike number (1.09) ↑

CKX act. (1.08) ↑

**Not changed traits:**

Spike length (1.05) =

Plant height (1.02) =

SPAD1 &amp; ns (0.96; 1.02) =

(A)

**Increased expression:**

CKX2.2.1 [1.75] ↑↑

CKX2.1 [1.57] ↑↑

↓?

**Decreased cytokinins:**

iP7G (0.57) ↓

tZOG (0.59) ↓

cZ9G (0.61) ↓

iP (0.76) ↓

o,m,pTs (0.88) ↓

tZ9GOG (0.70) ↓

tZ7G (0.78) ↓

DZOG (0.88) ↓

**Decreased other:**

IAA (0.73) ↓

PAA (0.76) ↓

ABA (1.00) =

**Increased expression:**

CKX5 [8.80] ↑↑↑

CKX1 [2.29] ↑↑

NAC [1.87] ↑↑

CKX11 [1.12] =

↓?

**Decreased cytokinins:**

tZOG (0.32) ↓

tZOGR (0.38) ↓

tZ9GOG (0.51) ↓

tZ7G (0.67) ↓

tZR (0.74) ↓

tZ9G (0.86) ↓

DZOG (0.88) ↓

cZ9G (0.90) ↓

**Decreased other:**

IAA (0.69) ↓

PAA (1.07) =

ABA (0.84) ↓

(B)

Rys. 3. Schematyczne przedstawienie wpływu wyciszenia *TaCKX1* (A) i *TaCKX2* (B) na koregulację ekspresji innych genów *TaCKX* i zawartości fitohormonów oraz cech związanych z plonem. [...] ekspresja względem kontroli; (...) wskaźnik ekspresji linii wyciszonych względem niewyciszonych; ↑↑, ↓↓ istotny wzrost, spadek; ↑, ↓ nieistotny wzrost, spadek.

W naszych badaniach zaobserwowano również dodatkowy wpływ procesu transformacji za pomocą *Agrobacterium*, niosącym kasetę wyciszającą, na ekspresję genów z rodziny *TaCKX*, metabolizm fitohormonów i cechy fenotypowe. Stwierdzono znaczne różnice w poziomach ekspresji genów czy zawartości fitohormonów pomiędzy nie transformowanymi liniami kontrolnymi uzyskanymi w kulturze *in vitro* a niewyciszonymi liniami uzyskanymi w wyniku transformacji. Sugerujemy, również w oparciu o literaturę, że techniki stosowane do przeprowadzenia modyfikacji genetycznej a konkretnie etap transformacji z użyciem *Agrobacterium* oraz regeneracja w kulturach *in vitro* mogą być stresorami wpływającymi na homeostazę cytokinin i innych fitohormonów.

Podsumowując udokumentowaliśmy, że wyciszanie genów *TaCKX1* i *TaCKX2* w dwóch badanych genotypach, pomimo pewnego podobieństwa mechanizmów koregulacji ekspresji genów, wpływało na zróżnicowanie cech plonotwórczych, zależne zarówno od odmiany jak i wyciszanego genu. Stwierdzone różnice w składzie i zawartości fitohormonów w kłosach 7 DAP obu badanych odmian mogą odzwierciedlać ich fenotyp dotyczący ościstości. Wykazano także, że cechy plonotwórcze mogą być modyfikowane w procesie transformacji za pomocą *Agrobacterium*. Powtórnie udokumentowano zależność pomiędzy poziomem wyciszania danego genu a regulacją cech fenotypowych. Z porównania efektu wyciszania genów rozwojowo-specyficznych w dwóch różnych odmianach wynika, że w celu uzyskania wysoko produktywnego ideotypu, należy wziąć pod uwagę specyfikę danego genu w określonym podłożu genetycznym.

## Podsumowanie i wnioski

1. Wyciszenie genu *TaCKX1* i *TaCKX2* za pomocą technologii RNAi wpływa na regulację innych genów z rodziny *TaCKX*, zawartość fitohormonów a przez to na fenotyp w zależności od poziomu wyciszenia.
2. Poszczególne, badane cechy plonotwórcze są regulowane pozytywnie lub negatywnie poprzez różne geny *TaCKX* i fitohormony. W roślinach odmiany Kontesa o silnym wyciszeniu *TaCKX1* obserwowano silny wzrost ekspresji genów *TaCKX2.1*, *2.2* i *9* i obniżenie ekspresji *TaCKX11*, i ten wzór ekspresji determinował wyższą produktywność roślin.
3. Silne wyciszanie genu *TaCKX1* w odmianie Kontesa prowadziło do zmian zawartości fitohormonów, głównie wzrostu form cytokinin degradowanych przez enzym CKX oraz zwiększenia liczby kłosów a przez to liczby nasion na roślinę, co było związane ze spadkiem MTZ.
4. Wykazano korelacje pomiędzy poziomem ekspresji badanych genów *TaCKX* a zawartością różnych form cytokinin i innych fitohormonów oraz cechami plonotwórczymi, jak MTZ, liczba ziarniaków, masa ziarna, długość kłosów i inne, wskazując na modele regulacji poszczególnych cech plonotwórczych. Na przykład MTZ jest silnie, negatywnie regulowana przez *TaCKX2.1*, pozytywnie przez *TaCKX11* oraz pozytywnie przez tZ, cZ, iP, GA.
5. Wyciszanie genów *TaCKX2.2* w odmianie Kontesa wpływało na ekspresję innych genów *TaCKX*, regulację fitohormonów, czego efektem fenotypowym był wzrost MTZ, zmniejszenie liczby ziaren na roślinę i wzrost zawartości chlorofilu w liściach flagowych.
6. Wyciszanie *TaCKX1* w odmianie Ostka Smolicka skutkowało istotnym wzrostem MTZ i masy korzeni siewek oraz wyższą liczbą i plonem ziaren. Wyciszenie *TaCKX2* w tej samej odmianie spowodowało istotny wzrost zawartości chlorofilu oraz niewielki spadek plonu i liczby ziaren.

7. Zaobserwowano mechanizm sprzężenia zwrotnego regulacji ekspresji. Wyciszenie *TaCKX1* u odmiany Ostka Smolicka wpływało na istotny wzrost ekspresji genów *TaCKX2.2.1* i *TaCKX2.1*, a wyciszenie genów *TaCKX2* powodowało istotny wzrost ekspresji *TaCKX1*. Podobny efekt wystąpił w przypadku wyciszania tych samych genów *TaCKX1* i *TaCKX2* u odmiany Kontesa. Regulacja ekspresji tych dwóch genów była niezależna od poziomu ekspresji innych genów *TaCKX*.
8. Zaobserwowano znaczące różnice w ekspresji *TaCKX* i metabolizmie fitohormonów między liniami pochodzącymi z kultury *in vitro* i niewyciszonymi liniami T<sub>2</sub>. Stres wywołany kulturą *in vitro* oraz transformacją różnymi wektorami za pośrednictwem *Agrobacterium* może mieć wpływ na ekspresję genów *TaCKX*, metabolizm fitohormonów i fenotyp.
9. Zawartość i skład fitohormonów w kłosach 7 DAP są zależne od odmiany i mogą wynikać z braku lub obecności ości w kłosie.
10. Udokumentowaliśmy, że regulacja cech związanych z plonem zależy od genotypu oraz poziomu ekspresji genów z rodziny *TaCKX*. Wyciszenie dwóch genów z rodziny *TaCKX*, tj. *TaCKX1* i *TaCKX2* dało odmienne wyniki fenotypowe dotyczące MTZ i liczby nasion w obu odmianach.

## Literatura

- AVALBAEV, A. M., SOMOV, K. A., YULDASHEV, R. A. & SHAKIROVA, F. M. 2012. Cytokinin oxidase is key enzyme of cytokinin degradation. *Biochemistry (Moscow)*, 77, 1354-1361.
- BRENNER, W., RAMIREDDY, E., HEYL, A. & SCHMÜLLING, T. 2012. Gene Regulation by Cytokinin in Arabidopsis. *Frontiers in Plant Science*, 3.
- ČERNÝ, M., DYČKA, F., BOBÁL'OVÁ, J. & BRZOBOHATÝ, B. 2010. Early cytokinin response proteins and phosphoproteins of Arabidopsis thaliana identified by proteome and phosphoproteome profiling. *Journal of Experimental Botany*, 62, 921-937.
- CHANG, C., LU, J., ZHANG, H.-P., MA, C.-X. & SUN, G. 2016. Copy Number Variation of Cytokinin Oxidase Gene *Tackx4* Associated with Grain Weight and Chlorophyll Content of Flag Leaf in Common Wheat. *PLOS ONE*, 10, e0145970.
- HE, X., QU, B., LI, W., ZHAO, X., TENG, W., MA, W., REN, Y., LI, B., LI, Z. & TONG, Y. 2015. The Nitrate-Inducible NAC Transcription Factor *TaNAC2-5A* Controls Nitrate Response and Increases Wheat Yield. *Plant Physiology*, 169, 1991-2005.
- HIROSE, N., TAKEI, K., KUROHA, T., KAMADA-NOBUSADA, T., HAYASHI, H. & SAKAKIBARA, H. 2007. Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation. *Journal of Experimental Botany*, 59, 75-83.
- JABLONSKI, B., BAJGUZ, A., BOCIAN, J., ORCZYK, W. & NADOLSKA-ORCZYK, A. 2021a. Genotype-Dependent Effect of Silencing of *TaCKX1* and *TaCKX2* on Phytohormone Crosstalk and Yield-Related Traits in Wheat. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 11494.
- JABLONSKI, B., SZALA, K., PRZYBOROWSKI, M., BAJGUZ, A., CHMUR, M., GASPARIS, S., ORCZYK, W. & NADOLSKA-ORCZYK, A. 2021b. *TaCKX2.2* Genes Coordinate Expression of Other *TaCKX* Family Members, Regulate Phytohormone Content and Yield-Related Traits of Wheat. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 4142.
- JABŁOŃSKI, 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. *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 4809.
- JAMESON, P. E. & SONG, J. 2015. Cytokinin: a key driver of seed yield. *Journal of Experimental Botany*, 67, 593-606.
- KIEBER, J. J. & SCHALLER, G. E. 2018. Cytokinin signaling in plant development. *Development*, 145.
- KIM, K., RYU, H., CHO, Y.-H., SCACCHI, E., SABATINI, S. & HWANG, I. 2012. Cytokinin-facilitated proteolysis of ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR 2 attenuates signaling output in two-component circuitry. *The Plant Journal*, 69, 934-945.

- LI, Y., SONG, G., GAO, J., ZHANG, S., ZHANG, R., LI, W., CHEN, M., LIU, M., XIA, X., RISACHER, T. & LI, G. 2018. Enhancement of grain number per spike by RNA interference of cytokinin oxidase 2 gene in bread wheat. *Hereditas*, 155, 33.
- LIU, Z., LV, Y., ZHANG, M., LIU, Y., KONG, L., ZOU, M., LU, G., CAO, J. & YU, X. 2013. Identification, expression, and comparative genomic analysis of the IPT and CKX gene families in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*). *BMC genomics*, 14, 1-20.
- LU, J., CHANG, C., ZHANG, H.-P., WANG, S.-X., SUN, G., XIAO, S.-H. & MA, C.-X. 2015. Identification of a Novel Allele of TaCKX6a02 Associated with Grain Size, Filling Rate and Weight of Common Wheat. *PLOS ONE*, 10, e0144765.
- OGONOWSKA, H., BARCHACKA, K., GASPARIS, S., JABLONSKI, B., ORCZYK, W., DMOCHOWSKA-BOGUTA, M. & NADOLSKA-ORCZYK, A. 2019. Specificity of expression of TaCKX family genes in developing plants of wheat and their co-operation within and among organs. *PLOS ONE*, 14, e0214239.
- PANDA, B. B., SEKHAR, S., DASH, S. K., BEHERA, L. & SHAW, B. P. 2018. Biochemical and molecular characterisation of exogenous cytokinin application on grain filling in rice. *BMC Plant Biology*, 18, 1-19.
- SHEWRY, P. R. 2009. Wheat. *Journal of Experimental Botany*, 60, 1537-1553.
- 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 Biology*, 12, 78.
- 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. *Journal of Experimental Botany*, 61, 1839-1851.
- ZHANG, J., YU, G., WEN, W., MA, X., XU, B. & HUANG, B. 2016. Functional characterization and hormonal regulation of the PHEOPHYTINASE gene LpPPH controlling leaf senescence in perennial ryegrass. *Journal of Experimental Botany*, 67, 935-945.
- 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 Phytologist*, 195, 574-584.