Universitat de les Illes Balears

TREBALL FI DE GRAU

UTILITZACIÓ DE CITOQUININES PER COMBATRE LA SEQUERA ALS CULTIUS DE CEREALS

Neus Cubo Ribas

Grau de Bioquímica

Facultat de Ciències

Any Acadèmic 2019-20

UTILITZACIÓ DE CITOQUININES PER COMBATRE LA SEQUERA ALS CULTIUS DE CEREALS

Neus Cubo Ribas

Treball de Fi de Grau

Facultat de Ciències

Universitat de les Illes Balears

Any Acadèmic 2019-20

Paraules clau del treball:

citoquinines, cultiu de cereals, sequera

Nom Tutor/Tutora del Treball Catalina Cabot Bibiloni

Nom Tutor/Tutora (si escau)

S'autoritza la Universitat a incloure aquest treball en el Repositori Institucional per a la seva consulta en accés obert i difusió en línia, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació	Autor		Tutor	
	Sí	No	Sí	No
	☒	☐	☐	☐

Índex

Resum i Abstract.....1

Abreviatures.....2

Representació gràfica.....2

Introducció

Paper del Canvi Climàtic dins el Canvi Global, un problema creixent.....3

La sequera, un dels principals problemes abiòtics creixents per l'agricultura en condicions de canvi climàtic.....3

Les citoquinines.....4

Objectiu.....8

Materials i mètodes.....8

Revisió

1. **Bioquímica de les citoquinines en condicions de sequera**.....9

1.1. Resposta dels gens metabòlics implicats en la via de senyalització de les CKs en condicions de sequera.....10

1.1.1. *IPT*.....10

1.1.2. *CKX*.....11

1.2. Resposta dels gens de senyalització implicats en la via de senyalització de les citoquinines en condicions de sequera.....13

2. **Efectes fisiològics que duen a l'increment de la eficiència dels cereals per les citoquinines en condicions de sequera**.....15

2.1. Equilibri hídric en els cereals.....15

2.2. Maquinària fotosintètica.....17

2.3. Creixement de la planta.....20

2.4. Modificació de la expressió gènica sensible a la sequera.....21

2.5. Defensa davant dany oxidatiu.....22

3. **Conclusions**.....24

Bibliografia.....25

Resum

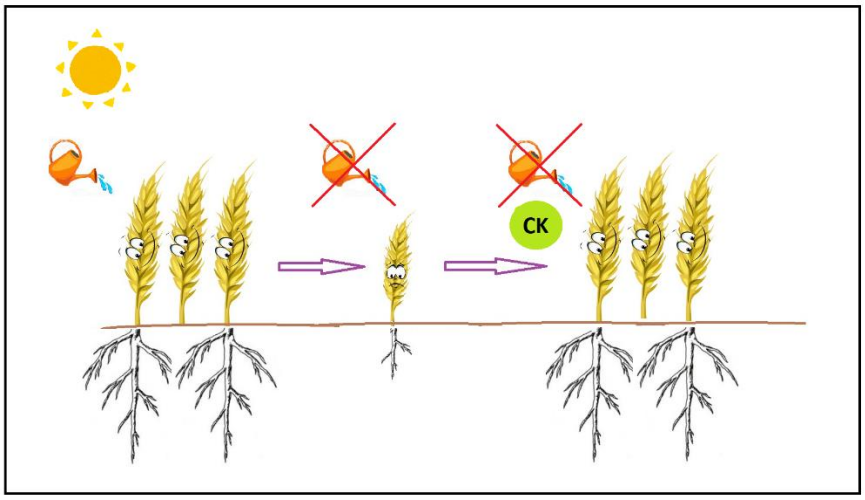
Els cereals són la principal font de calories per la major part de la població humana. Amb el creixement de la població s'estima que pel 2050 es necessitarà el doble de la seva producció, però es prediu que, pel mateix any, la sequera induïda pel canvi climàtic redueixi la seva eficiència de producció al 50 %, lo que suposa un gran problema a escala global. Davant aquesta situació, existeix un gran nombre d'estudis que intenten posar remei a aquest problema. Una proposta és regular la concentració de les fitohormones implicades en la resposta de la sequera de les plantes de cereals. En aquest treball es revisa la bibliografia obtinguda fins ara en relació a la regulació de la fitohormona citoquinina com a possible solució i la seva aplicació biotecnològica al desenvolupament de cultius de cereals tolerants a la sequera. S'ha mostrat que, tant l'increment de la concentració de CKs en les parts aèries, com la seva disminució a les arrels, exerceixen un efecte positiu sobre la eficiència del cultiu de cereals a causa de la seva naturalesa pleiotròpica. Les adaptacions que duen a la millora en l'eficiència són la regulació de l'equilibri hídric de la planta, la maquinària fotosintètica, el creixement, la defensa antioxidant i la modificació de la expressió gènica dels gens sensibles a la resposta a la sequera. Encara així, manca molta informació i es necessiten molts més assajos per dilucidar els mecanismes d'acció implicats, a més de la seva possible coordinació amb altres molècules d'interès com són l'etilè o l'àcid abscísic per poder desenvolupar cultius tolerants a la sequera, la solució a un problema a nivell global.

Abstract

Cereals are the main source of calories for most of the human population. Due to population growth, it is estimated that by 2050 it will need twice its production, but it is predicted that, by the same year, the drought induced by climate change will reduce its production efficiency by 50%, which means a big problem on a global scale. Given this situation. Given this situation, there are many studies that try to remedy this problem. One proposal is to regulate the concentration of phytohormones involved in the drought response of cereal plants. This paper reviews the literature obtained so far in relation to the regulation of the phytohormone cytokinin as a possible solution and its biotechnological application to the development of drought-tolerant cereal crops. Both the increase in the concentration of CKs in the aerial parts and their decrease in the roots have been shown to have a positive effect on the efficiency of cereal cultivation due to their pleiotropic nature. Adaptations that lead to improved efficiency include the regulation of the plant's water balance, photosynthetic machinery, growth, antioxidant defense, and modification of gene expression of drought-responsive genes. Still, there is much missing information and many more tests are needed to elucidate the mechanisms

of action involved, as well as their possible coordination with other molecules of interest such as ethylene or abscisic acid in order to develop drought-tolerant crops, the solution to a global problem.

Representació gràfica



Abreviatures

CK	Citoquinina	**BAP**	6-bencilaminopurina
IPT	Isopental transferasa	**TDZ**	Tidiazuron
CKX	Citoquinina oxidasa/deshidrogenasa	**ATP**	Adenosin trifosfat
HK	Senseor Histidina quinasa híbrid	**UGT**	UDP glicosiltransferasa
HP	Histidina fosfo-transferasa	**CRE1**	Element de resposta a citoquinina 1
RR	Regulador de resposta	**RE**	Reticle edoplasmàtic
ZOG	Zeatina O-glucosil transferasa	**ET**	Etilè
GLU	β- glucosidasa	**SARK**	Receptor de senescència associat a proteïna quinasa
PS	Fotosistema	**ROS**	Espècies reactives d'oxigen
BR	Brassinoesteroides	**APX**	Ascorbat peroxidasa
IAA	Auxines	**CAT**	Catalasa
GA	Gibberel·lines	**GR**	Glutatió reductasa
SA	Àcid siàlic	**DHAR**	Deshidroascorbat reductasa
JA	Jasmonat	**ABA**	Àcid abscísic

Introducció

Paper del Canvi climàtic dins el Canvi Global, un problema creixent

El canvi global fa referència al conjunt de canvis i transformacions a escala planetària que alteren la dinàmica i l'estructura dels ecosistemes terrestres i marins. Es deu a petites modificacions del sistema Terrestre (natural) i a factors socio-econòmics (antropogènic). Les modificacions en el sistema Terrestre han passat sempre a la llarga de la història, però la intensificació de les activitats antropogèniques durant el darrer segle han incrementat la alteració dels components biofísics (atmosfera, oceans, recursos hídrics, sols, biodiversitat...) que tenen el seu efecte sobre els sistemes biològics, com ecosistemes, comunitats i en el sistema socioeconòmic [2].

El canvi global és conseqüència de múltiples variables que afecten de manera sinèrgica sobre els sistemes biològics. A grans trets, les causes del canvi global són el canvi en l'ús del territori, les invasions biològiques, variacions en la composició atmosfèrica per l'increment de la concentració de diòxid de carboni i altres gasos i modificació en la concertació d'ozó estratosfèric i troposfèric. A més del canvi climàtic que produeix un increment de l'escalfament, canvis en la precipitació i evotranspiració i episodis climàtics catastròfics [2].

El canvi climàtic és la modificació del clima que altera la composició atmosfèrica mundial a causa de l'increment de la temperatura mitjana planetària. És atribuït de forma directa o indirecta a la activitat humana i observada durant períodes de temps comparables [3]. Actualment, ja hem començat a observar les conseqüències del canvi climàtic i s'estima que els seus impactes afectaran en un futur d'una manera cada vegada més severa [4], [5]. S'espera un deteriorament en les condicions agroecològiques a causa de la constant expansió de la població mundial, amb una reducció en el nivell de producció [6], [7]. És així, un factor clau de caire antropogènic que indueix un Canvi a nivell Global. De fet, el benestar humà com el de l'agricultura es troben en perill pel canvi climàtic [8] i la magnitud de l'impacte dependrà de les nostres eleccions col·lectives. És, per tant, un dels problemes més urgents que enfronta la humanitat en la actualitat.

La sequera, un dels principals problemes abiòtics creixents per la agricultura en condicions de canvi climàtic

Els factors abiòtics són els factors ambientals (físics o químics) que afecten els organismes vius i el funcionament dels ecosistemes [9]. La sequera i la salinitat són considerats sovint els principals factors abiòtics que limiten la productivitat de les plantes de conreu [10], [11]. Davant l'increment de la freqüència de les tensions abiòtiques, les plantes responen

mitjançant una sèrie de mecanismes fisiològics a nivell molecular, cel·lular, tissular, morfològic i d'organisme sencer. Les respostes varien en funció de la espècie, genotip, duració i gravetat de l'estrès i etapa de desenvolupament [12]–[14]. En particular, la sequera afecta negativament a la fotosíntesi, absorció de nutrients i el metabolisme cel·lular [15]. La disminució de la concentració de clorofil·la produeix una alteració en la estabilitat de la membrana cel·lular, el contingut d'aigua de les fulles i un increment del dany induït per oxidació [16], [17].

Els cereals són la font més important de calories per la major part de la població humana. Proporcionen aproximadament el 56 % de l'energia alimentària i el 50% de la proteïna consumida [18]. A causa de l'increment de la població humana, el consum de carn i lactis i la indústria de biocombustibles, els valors s'hauran d'incrementar en un 60 % a 110 % per 2050 [19]. La regla empírica bàsica mostra que per cada grau d'escalfament, la producció de la collita disminueix un 10 % [20]. S'estima que pel 2050, s'incrementin 5 ºC a nivell mundial, lo que podria suposar una disminució del 50 % en la producció de cereals. Per lo que, pel creixement de la població, les Nacions Unides estima que pel 2050 necessitaríem el doble d'aliments que a dia d'avui [21] i la producció de cereals es veu cada cop menys eficient, lo que suposa un gran problema a nivell mundial.

En condicions de sequera induïda pel cavi climàtic, l'agricultura s'ha d'adaptar als nous patrons de pluges [22]. Els cultius de cereals són molt més tolerants a la sequera que altres plantes, ja sigui ordi, blat, blat de moro o arròs. Es coneixement molecular sobre la funció protectora de les cèl·lules de guarda que envolten l'estoma és encara molt limitada [23]–[27]. Una investigació realitzada a la Universitat de Wüzburg, Alemanya, comprovà mitjançant estudis de transcriptòmica que l'increment de la seva eficiència es deu a la modificació de dos aminoàcids dels canals SLAC1 de transport d'ions de les cèl·lules de guàrdia dels estomes [28]. Encara que la seva tolerància sigui major, el rendiment dels cultius de cereals disminueix cada cop més amb l'increment de la sequera, lo que indueix una disminució de la seva productivitat i un problema creixent per la obtenció d'aliment a nivell mundial [29]–[32].

Les citoquinines

Les citoquinines (CKs) són fitohormones derivades de l'adenina que regulen el creixement i desenvolupament de les plantes, incloent la divisió cel·lular, l'inici i creixement de les brots, la senescència de les fulles, el domini apical, les relacions sumider/font, l'absorció de nutrients, la fil·lotaxis, el desenvolupament vascular, gametòfit i embrionari i la resposta a factors biòtics i abiòtics [33]; Tenen efectes contrastants en brots i les arrels [34], [35], per lo que tenen un efecte pleiotròpic. La primera CK natural identificada fou

la zeatina [36]. Les CKs també apareixen a certs tRNA de fongs, algues, animals i microorganismes [37].

Estructuralment, les CKs naturals o endògenes són molècules derivades de la base púrica adenina (6-aminopurina) amb un substituent, aromàtica o isoprenoide, unida al nitrogen amínic de la posició 6 de l'anell purínic. Les CKs aromàtiques inclouen la benciladenina, topolina i kinetina. Les isoprenoides inclouen la zeatina, isoisopentiladenina i dihidrozeatina, amb els respectius derivats glicosilats. Per altra banda, també existeixen CKs sintètiques o exògenes com és el cas de la 6-bencilaminopurina (BAP) o el tidiazuron (TDZ) [33], [38].

Les plantes poden obtenir CKs a partir de la hidròlisi dels tRNA amb CKs mitjançant l'enzim tRNA-IPT (isopentil transferasa). Encara que la major part és sintetitzada *de novo* directament per les plantes mitjançant l'enzim ATP/ADP IPT. A *Arabidopsis*, les tRNA-IPT són IPT2 i IPT9, mentre que les ATP/ADP IPT són IPT1,3-8 [39]. Es produeixen als meristemes de les arrels, als òrgans aeris i, durant el desenvolupament de les llavors, a l'endosperma. Encara que les fulles les sintetitzen, s'assumeix que la font principal són les arrels. Un cop sintetitzades, es distribueixen via xilema i/o floema al seu lloc d'acció. A nivell cel·lular, es sintetitzen majoritàriament als plasts, però es desconeix si empren sistemes de transport específics per la seva distribució intracel·lular. Les CKs es poden moure per difusió o emprant sistemes selectius de transport anomenats permeases de purina (PUP) de les membranes plasmàtiques [40].

Fins ara, l'únic enzim identificat en les plantes capaç de realitzar el procés de degradació de CKs és la citoquinina oxidasa/deshidrogenasa (CKX). Es tracta d'una proteïna monomèrica de 60 kD que regula els nivells endògens de CK. A més, també es poden inactivar reversiblement mitjançat la zeatina O-glucosil transferasa (ZOG), reactivar amb β- glucosidases (GLU) i N-glusosidar irreversiblement per la UDP glicosiltransferasa (UGT). Aquests enzims s'expressen de manera diferencial en espai i temps [40].

Entendre la via de senyalització de les CKs és clau per entendre el seu mecanisme d'actuació en la resposta enfront la sequera, per lo que l'estudi dels elements que formen part d'aquesta via es troben sota un estudi extens. Aquesta via implica quatre esdeveniments de fosforilació entre residus d'histidina i aspartat de tres proteïnes diferents: el sensor histidina quinasa híbrid (HK), la histidina fosfo-transferasa (HP) i el regulador de resposta (RR). Els receptors de CK són sensors histidina quinasa híbrids. Estudis genètics han mostrat que estan codificats pels gens *CKI*, però encara que no s'ha pogut demostrar la seva unió de manera fisiològica [40].

A *Arabidopsis thaliana* s'han identificat 3 receptors AHK (*Arabidopsis* histidina quinasa) implicats en la via de senyalització de la CK: AHK de tipus 2, 3 i 4. AHK4 també es coneix amb el nom de CRE1 (de l'anglès, *cytokikin response 1)*. Cada un d'ells té funcions biològiques i propietats bioquímiques específiques. En absència de CKs els receptors AHK actuen com a fosfatases i desfosforilen les fosfotransferases [41]. Encara es desconeix la seva localització cel·lular predominant. Al principi de les investigacions es pensà que es trobaven majoritàriament en la plasma membrana. Malgrat això, assajos d'unió a CK, proteïnes de fusió fluorescents i el fraccionament bioquímic mostraren que es trobaven en major proporció en el reticle endoplasmàtic (RE) [42], [43]. Lo que podria suposar que el RE té un paper central en la via de senyalització de les CKs, representada a la *figura 2*. Actualment, la seva localització és un tema controvertit i no es descarta el paper d'aquests receptors en la membrana plasmàtica. La seva localització podria dependre del tipus cel·lular (lloc) i etapa del desenvolupament [44]. Tots els receptors AHK presenten un domini extracel·lular d'unió a lligand *CHASE* (ciclasa/histidina quinasa associat al sensor extracel·lular) amb dos o tres segments transmembrana (TM), un domini histidina quinasa (HK) amb un residu histidina i un domini receptor (RD) amb un residu aspartat. Ambdós residus són susceptibles de fosforilació; com es mostra en la *figura 1*.

Per altra banda, les histidina fosfotransferases (AHP, a *Arabidopsis*) transmeten la senyal des del receptor fins als reguladors de resposta mitjançant el seu transport al nucli amb la fosforilació del residu d'histidina, com es mostra en la *figura 2*. Contenen un residu d'histidina susceptible de fosforilació (representat a la *figura 1*). Finalment, els reguladors de resposta (ARR, a *Arabidopsis)* són els components que tanquen la via de senyalització de les CKs. Poden ser de tipus A i B. Els receptors de tipus A són de resposta primària a les CKs i la seva expressió es veu afectada per l'increment de la concentració de les CKs. Pel contrari, els de tipus B són factors de transcripció que no es veuen afectades per l'increment dels nivells de CK. Actuen primer que els tipus A i contenen una domini anomenat *GARP* que s'uneix a molts gens de resposta primària a les CKs, concretament al promotor *CRE* (de l'anglès, *cytokinin responsive element)*, que també es troba al gen ARR-tipus A. Els ARR-tipus A es poden trobar al nucli i/o al citoplasma. Estudis amb mutants dels ARR-tipus A han mostrat que es poden expressar de forma constitutiva o localitzada, però encara es sap molt poc sobre la seva funció molecular. S'ha vist que la seva sobreexpressió disminueix la sensibilitat a les CKs. Mentre que altres estudis mostren que són reguladors positius de la ruta de senyalització. Ambdós tipus de reguladors de resposta interactuen amb els diversos efectors implicats en la acció fisiològica de les CKs [40] i presenten diferències en els seus dominis, representats en la *figura 1*. Els ARR-A tenen un domini receptor (RD) i un domini àcid (AD) C-terminal. A més, els ARR-B tenen

un domini d'unió a DNA de tipus *GARP* (acrònim de les 3 primeres proteïnes de la família), una senyal de localització nuclear (NLS) i un domini *output (OD).*

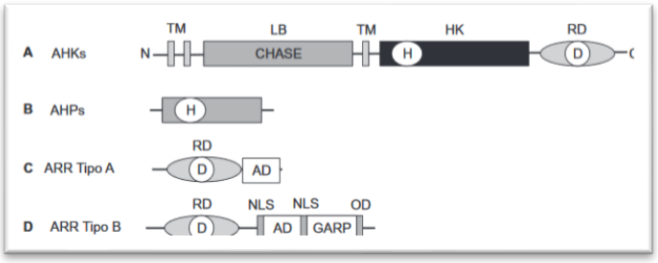


Figura 1. *Característiques estructurals de la via de senyalització de CKs a A. thaliana* [40]. *(A)* ***Receptors AHKs****. Tots tenen un domini extracel·lular d'unió a lligand CHASE (ciclasa/histidina quinasa associat al sensor extracel·lular) amb dos o tres segments transmembrana (TM), un domini histidina quinasa (HK) i un domini receptor (RD). H i D són residus histidina i aspartat, respectivament, susceptibles a fosforilació. (B)* ***Fosfotransferases (AHPs).*** *(C i D)* ***Reguladors de resposta a A. thaliana (ARR).*** *(C) Els ARR-A tenen un domini receptor (RD) i un domini àcid (AD) C-terminal. (D) Els ARR-B tenen a més un domini d'unió a DNA de tipus GARP (acrònim de les 3 primeres proteïnes de la família). NLS: senyal de localització nuclear; OD: domini output.*

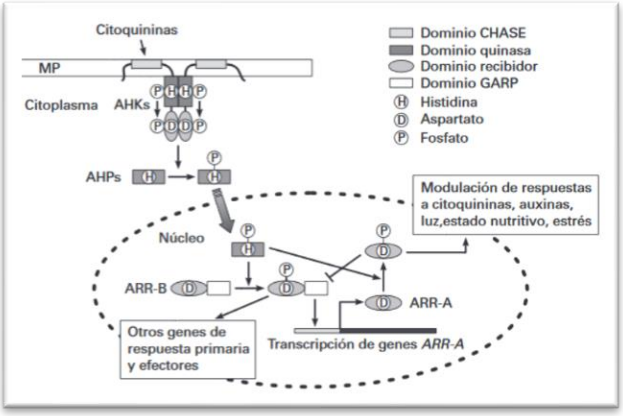


Figura 2. *Via de senyalització de les CKs* [40]. *La unió hormonal al domini CHASE de AHK indueix la seva dimerització i autofosforilació en el residu H del domini quinasa. El fosfat és transferit al residu D del domini receptor d'AHK. Seguidament, es transfereix el fosfat a al residu H d'AHP, lo que li permet entrar en el nucli cel·lular. El fosfat és transferit al residu D d'ARR-B, lo que permet l'activació de la transcripció dels gens ARR-A i altres gens de resposta primària a CK. ARR-A inhibeixen la via de senyalització reprimint la seva pròpia transcripció o modulant (positiva o negativament) la activitat de CK o altres vies de senyalització mitjançant interaccions proteïna- proteïna.*

Un altres possible mecanisme de regulació de la ruta de senyalització implica la fosfotransferasa AHP6. Aquesta no conté el domini conservat histidina necessari per la fosfotransferència, actuant així com un regulador negatiu de la via de senyalització. S'ha vist que es troba implicada en la formació del protoxilema de les arrels d'*Arabidopsis* [45].

La via de senyalització de les CKs es veu modificada pels estímuls ambientals, com la variació de la temperatura, nivell de nutrició, condicions osmòtiques i, el que es tracta en aquest treball, la sequera [40].

Els beneficis de la aplicació de CKs en els cultius de cereals es relacionen amb un retard en la senescència de les plantes, lo que es tradueix amb una millora en la producció de cereals. La senescències és un fenomen natural de l'envelliment fisiològic en les plantes, és la etapa final del desenvolupament. En les fulles, els esdeveniments implicats en la senescència són: pèrdua de clorofil·la, disminució de la fotosíntesi, degradació de macromolècules, reubicació de nutrients, eliminació de components cel·lulars i, finalment, la mort cel·lular [46]. La bibliografia dóna suport a la idea que la aclimatació a la sequera mitjançada per CK es deu principalment a la senescència tardana [47].

S'ha demostrat que un increment en la síntesi de CKs endògenes o la aplicació de CKs exògenes incrementa la mobilització de nutrients i endarrereix la senescència, lo que duu a un increment de la producció. Estudis realitzats sobre la varietat d'arròs *Oryza sativa* transgèniques, amb un increment de la expressió de P_{SARK}*::IPT*, mostraren un retard en la senescència foliar [48], [49]. El problema fins ara són la manca d'estudis per dilucidar els mecanismes d'acció implicats en el cas del cereals. Un d'ells podria estar relacionat amb l'etilè (ET), fitohormona implicada en la senescència foliar. Són nombrosos els estudis que mostren la relació entre la CK, l'ET i la senescència en altres espècies de plantes [50], el problema radica en el seu estudi pel cas concret dels cereals, pues no s'ha dilucidat encara bé aquest mecanisme i els seus efectes podrien diferir.

Cal emfatitzar que l'eix central d'aquest estudi són cereals. Aquests són plantes monocotiledònies i monocàrpiques, per lo que al llarg del treball, s'expliquen vies de senyalització i processos que podrien diferir de les dicotiledònies.

Objectiu

L'objectiu del treball és revisar la informació obtinguda fins ara en relació a les CKs pel cas concret del cultiu de cereals per veure si és plausible la regulació de CKs endògenes pel desenvolupament de cultius tolerants a la sequera, un dels principals factors abiòtics causats pel canvi climàtic, i solucionar així el problema de la manca de cereals que es prediu pel 2050.

Materials i mètodes

Es realitzà una anàlisi bibliogràfica pel desenvolupament d'aquesta revisió. Es consultà fonamentalment el cercador online *Google Academy*. Inicialment, es realitzà una recerca

general introductòria de les CKs en el llibre "*Fundamentos de Fisiología Vegetal*". A més, es realitzà una recerca online de la problemàtica, la situació actual del cultiu de cereals sota condicions de sequera induïda pel canvi climàtic, un dels factors que ha induït el canvi global. Per la recerca de la situació actual, s'emprà el cercador *Google* amb la introducció de les paraules "*global warming*", "*climate change*", "*cambio global*", "*cereal*" i "*drought*", de 186.000.000 de resultats, se'n llegiren 45 articles i pàgines WEB per ajudar a la comprensió el tema i se'n seleccionaren 32. La selecció es realitzà per major relació entre els conceptes de "*global warming*", "*climate change*" i "*cambio global*" amb els conceptes "*cereal*" i "*drought*". Per ajudar a centrar el tema a la part introductòria, s'utilitzà el llibre "El planeta inhóspito"[1].

Seguidament, es procedí a la recerca online de l'efecte de les citoquinines sobre l'eficiència del cultiu de cereals. En aquesta recerca, s'introduiren les paraules clau *"Cytokinin", "drought", "cereal" "production"*, s'obtengueren 555.000 resultats en el cercador Google i 14.000 articles relacionats a *Goole Academy.* A partir d'aquí, la recerca específica per a cada un dels apartats s'aconseguí mitjançant la introducció de les paraules anteriors més les específiques de cada apartat: *"IPT", "CKX", "AHK", "ARR","ABA", "water potential", "GI", "photosynthesis", "growth", "oxidative damage", "APX", "CAT", "DHAR", "GR", "gen expression", "GA", "BR", "IAA", "ET", "root", "chlorophyll".* A l'hora de fer la selecció de la bibliografia, es tengueren en compte els objectius a comentar en cada un dels apartats del treball. Així, es seleccionaren 75 articles finals de 153 llegits. El criteri de selecció per llegir l'article fou d'aquells que establien la relació antre els conceptes generals (*"Cytokinin", "drought", "cereal" "production")* i cada un dels conceptes específics. D'aquests, finalment es seleccionaren aquells articles més actuals i amb resultats mes clars i específics pel cultiu de cereals. A més, s'han afegit les figures del treball que s'han considerat més idònies per la comprensió del text de forma més senzilla.

Revisió

1. BIOQUÍMICA DE LES CKs EN CONDICIONS DE SEQUERA

Per veure si és plausible la obtenció de cultius tolerants a la sequera en els següents apartats, es revista com afecta l'increment o disminució dels nivells de CKs a nivell fisiològic pel cas concret de cereals sota condicions d'estrès hídric i els principals gens i elements, dilucidats fins ara, implicats en el mecanisme d'acció de les CKs .

En aquest apartat es revisa la informació actual de com afecta la regulació de la expressió dels gens relacionats amb el metabolisme i senyalització de la CK implicats en la resposta

a l'estrès hídric pel cultiu concret de cereals. Es tracta d'una part essencial per veure com afecta la regulació de cada un d'ells en els efectes a nivell fisiològic de la planta i en l'increment de la eficiència d'aquesta.

1.1. Resposta dels gens metabòlics implicats en la via de senyalització de les CKs en condicions de sequera

1.1.1. IPT

Hi ha un nombre creixent d'investigacions que estudien la participació de la família de gens IPT en la regulació de la resposta de defensa de les plantes de conreu al dèficit hídric. Estudis de genoma complet, han permès identificar 9 membres de la família en el blat de moro [51], 14 en la soja [52] i 10 en l'arròs [53].

Una manera de veure com afecta la seva regulació davant una situació de sequera, és mitjançant la utilització de plantes transgèniques. A més, s'ha relacionat una millora del rendiment del gra amb una disminució de la senescència per part de la planta. S'han realitzat estudis amb utilització de plantes transgèniques sobre plantes d'arròs i blat en els que incrementant la expressió dels promotors del gen IPT *HSP70, SEE1, SAG12 i SARK*. Els estudis mostraren un retard en la senescència foliar i un increment de la tolerància a la sequera, però només alguns d'ells augmenten la eficiència i només en condicions d'aigua i nutrients limitats (*HSP70* i *SARK*) [54], [55], [56]. La manca de l'increment de l'eficiència en el cas dels promotors *SEE1* i *SAG12* s'ha relacionat amb que la seva inducció, a més de produir un retard en la senescència foliar, també indueixen un retard de transport dels metabòlits de les fulles senescents als grans, per lo que indueixen també un retard en la mobilització de nutrients [55]. Per tant, la selecció del promotor idoni és clau en la regulació de la expressió del gen *IPT* i en el seu efecte sobre la adaptació de les plantes a la sequera.

Un estudi realitzat sobre plantes d'arròs, en el qual se li va introduir el gen $P_{SARK::}IPT$ mitjançant la transformació amb un vector binari pBI101 i un creixement en una cambra de creixement mostrà una millora en la resistència de la mort, una millora en la tolerància a la sequera i un augment en el rendiment del gra del 144 % i del 158 % respecte el control d'abans de l'antesi i després, respectivament [48]. Un altre estudi realitzat també sobre la expressió induïble per estrès i maduració del promotor *SARK* sobre plantes d'arròs crescudes en un hivernacle, mostrà un increment de la tolerància a la sequera a través de la regulació coordinada de l'assimilació de carboni i nitrogen [49]. Per contra, altres autors han mostrat la seva preocupació sobre el contingut de Nitrogen (N). Experiments realitzats sobre blat de moro transformat amb el promotor de senescència *SEE*, s'associà amb la captura funcional de C, però algunes línies mostraren una reducció en la utilització de N en les fulles més joves [56]. Si bé l'autor mostra que la problemàtica es podria solucionar

amb l'addició de N extern, és una característica que s'hauria de tenir en compte pel desenvolupament de cultius sostenibles, en el qual es vol reduir la seva aplicació.

Per altra banda, també s'ha aconseguit un retràs de la senescència de les fulles fent que les plantes romanguessin verdes, tant en arròs [57], com en ordi [58]. A més, també es mostrà un retràs en la senescència foliar i una major retenció de clorofil·la a es fulles mitjançant la utilització de blat transgènic emprant el transgen *AtMYB*$_{32xs\text{-p}}$*::IPT* (mieloblastosis). S'ha relacionat el promotor *AtMYB*$_{32xs\text{-p}}$ amb la activació de la expressió gènica durant el desenvolupament de les arrels laterals i les anteres a *A. Thaliana* [59]. Un estudi molt recent del 2019 mostrà la millora en el creixement i l'eficiència del blat pel retard de la senescència de les fulles emprant el transgen *AtMYB*$_{32xs\text{-p}}$*::IPT* en plantes de blat transgènic crescudes en condicions de camp. S'observà un increment en la eficiència del 26-42 % respecte el grup control.

Un estudi de transcriptòmica demostrà que en condicions de sequera a *Arabidopsis* es veu disminuïda la expressió de *AtIPT3 i AtIPT9,* mentre que la expressió de *AtIPT1, AtIPT2, AtIPT4, AtIPT5, AtIPT6, AtIPT7 i AtIPT8* es veren incrementats. S'observà el mateix pel cas de l'arròs, la sequera indueix la expressió del gen *OsIPT5,* però inhibeix la expressió de transcripcional de *OsIPT2* [60]. A més, un estudi recent ha mostrat que l'increment de CO_2 a les arrels indueix la formació de sucres generats fotosintèticament, lo que incrementa la concentració de *AtIPT3* [61].

Per tant, podria significar que cada membre de la família dels gens *IPT* tenen una funció única durant l'estrès per sequera en un lloc i/o moment del desenvolupament específic. Per lo que seria important estudiar cada un d'ells individualment per saber com afecta la modificació de la seva regulació en el comportament de la planta davant un estrès abiòtic com és la sequera i poder incrementar així la productivitat del cultius de cereals. A més, també seria d'interès la relació entre la utilització d'un promotor específic i al membre de la família *IPT* que afecta, ja que, com s'ha esmentat¸ els efectes sobre la producció varien en funció del promotor emprat.

1.1.2. CKX

Un altre component important en el metabolisme de les CKs és l'enzim CKX. Com s'ha esmentat anteriorment, la família de l'enzim CKX està implicada en la inactivació irreversibles de les citoquinines, eliminant la cadena lateral i inhibint així la seva activitat. Els estudis d'associació de tot el genoma han mostrat que la família consta de 13 membres en el blat de moro [62] i 11 en el cas de l'arròs i el blat [53], [63]. Les línies d'investigació suporten la idea que la seva regulació està implicada en la modificació fisiològica dels

cereals i el desenvolupament de les plantes en condicions de sequera, lo que incrementa la producció en cultius de cereals.

La seva acció, com en el cas anterior, també pareix ser diferencial pel que fa al lloc d'acció i temps d'exposició pels diferents tipus de CKX. Per exemple, les plantes *Arabidopsis* transgèniques crescudes a un hivernacle amb un increment en la expressió del gen *CKX1* a les arrels, mostraren un increment en la degradació de CKs endògenes a les arrels, lo que augmentà la longitud de les arrels primàries i la formació d'arrels laterals durant l'estrès per sequera, mentre que la part aèria romangué constant. L'estudi mostrà una major eficiència per part de les plantes transgèniques en la tolerància a la sequera i un major contingut d'elements foliars, lo que proporcionà un major contingut de clorofil·la en condicions de limitació de nutrients [64]. Per contra, un altre estudi realitzat sobre ordi transgènic amb una sobreexpressió de *AtCKX1* cultivades en una cambra ambiental de fotoperíode, mostraren una reducció de les arrels primàries en comparació al grup control, però un increment de les arrels secundàries. Pel que fa a la part aèria, s'observà una disminució de l'altura de la planta en comparació al control, però un major pes sec total de la part aèria, lo que indica un increment en el nombre de brots secundaris, lo que tengué una millora a la tolerància a la sequera, encara que no es realitzaren estudis de rendiment i qualitat del gra [65].

A més, estudis de transcriptoma complet realitzats sobre plantes transgèniques d'ordi han mostrat que la sobreexpressió del gen *AtCKX1* manté un major contingut d'aigua, millora el creixement i el rendiment, augmenta el creixement de les arrels, altera l'expressió gènica sensible a la sequera i millor la tolerància a l'estrès per sequera [65], [66]. Mentre que la seva expressió constitutiva en blat mostrà un efecte letal per la planta [67]. Pareix ser que la sobreexpressió de les formes *AtCKX1* i *AtCKX3* (localitzades als vacúols) tenen un fenotip més fort que la sobreexpressió de les formes *AtCKX2* i *AtCKX4* (localitzades a l'apoplast) [65], lo que afirma la idea de la expressió diferencial en funció del tipus de CKX, tant en temps com en funció i espai.

Aquests estudis mostren una regulació negativa de les CKs en la resposta a l'estrès per sequera, ja que la sobreexpressió localitzada de CKX, indueix una degradació localitzada de CKs que proporciona una millora en la supervivència i de tolerància en condicions de dèficit hídric.

Si bé l'increment en la concentració de CKs endògenes per l'increment de la expressió del gens *IPT* a les parts aèries produeix un retard en la senescència i un increment en la producció de cereals, s'aporta evidència que la degradació de CK i una disminució de la

seva concentració en altres regions i/o moment determinat, com les arrels, també tenen el mateix efecte positiu sobre l'increment de la producció del cultiu de cereals.

De manera que, existeix una gran família de cada gen implicat en la via de senyalització de les CKs i que, mentre l'increment de certs gens d'una mateixa família impliquen una millora en la tolerància de la planta, la disminució de la expressió d'altres membres de la mateixa família, també ho fan. A més, cada un d'ells actuen en un temps i lloc específic. Aquet fet podria explicar perquè la disminució de la biosíntesi o activitat de les CKs a regions determinades exerceixen un efecte positiu en els cereals, actuant damunt de determinats membres de la família de gens concrets.

Per això, es necessària més evidència empírica a nivell gènic per entendre la regulació de la expressió gènica diferencial en quant a temps i espai de les CKs en el cas concret del cultiu de cereals.

1.2. Resposta dels gens de senyalització implicats en la via de senyalització de les citoquinines en condicions de sequera

Com s'ha esmentat en l'apartat anterior, la via de transducció de las CKs en les plantes incorporen tres elements de senyalització: els receptors HK, la histidina fosfo-transferasa (HP) i el regulador de resposta (RR). A *Arabidopsis* les CKs s'uneixen als receptors AHK, activant la via de senyalització, fosforilen les AHP en el residu d'Histidina i activen els reguladors de resposta tipus B (ARR-B) i, un cop activats, permeten la expressió dels ARR-A.

Un estudi realitzat sobre plantes *d'Arabidopsis* transgèniques cultivades *in vitro* amb pèrdua de funció pels receptors AHK2, 3 i 4/CRE1 mostrà que aquests actuen com a reguladors negatius en la resposta a l'estrès osmòtic mitjançat per l'acció de les CKs, lo que implica un efecte positiu en la resposta a l'estrès per sequera [68]. 5 anys més tard, un estudi de la universitat de Urmia realitzat *in vitro* trobà evidència de dos gens homòlegs a *AHK2* i *CRE1* al blat: *ZmHK3a* i *ZMHK1*, respectivament, que també responen a la sequera [69]. Encara així, es desconeix el mecanisme d'actuació que propicia l'increment en la tolerància a la sequera d'aquests elements en els cereals, per lo que és necessària més investigació.

Els elements de resposta RR de tipus A i B permeten la activitat multifuncional de les CKs [70]. A *Arabidopsis* s'ha observat que la expressió dels ARR-A inhibeixen la expressió dels ARR-B i, per tant, de la via de senyalització de les CKs com a mecanismes de retroalimentació negatiu, però també es desconeix encara el mecanisme d'actuació [71]. Un estudi en el qual es realitzaren anàlisis de tot el genoma dels gens que responen a CKs

a la varietat d'arròs *Oryza sativa L.* cultivades en un hivernacle mostrà una resposta de regulació negativa similar a la de *Arabidopsis* [72]. Els ARR-B estan associats a la resposta a l'estrès abiòtic, regulant negativament la resposta de les plantes a la sequera [70]. Les seves respostes s'han associat al control de mecanismes hormonals, la defensa antioxidant i la iniciació lateral de les arrels [10].

Estudis més recents han donat evidències sòlides d'un possible mecanisme que involucra la via de senyalització de les CKs amb l'àcid abscísic (ABA). ABA és una fitohormona implicada en la resposta a la sequera. En condicions de sequera, els nivells d'ABA s'incrementen i indueix el tancament estomàtic per evitar la pèrdua d'aigua per transpiració, mitjançant canvis en el potencial de membrana i el fluxe d'ions [73].

Com, tant l'increment de les CKs , com el de ABA produeixen un increment de la tolerància a la sequera per part de la planta, es podria esperar que en un mecanisme conjunt, actuïn de forma sinèrgica. Però la evidència ha mostrat que actuen de forma antagònica i que, això produeix un efecte positiu en la resposta de la tolerància dels cereals a la sequera [10].

S'ha descrit que, en condicions de sequera, l'acumulació d'ABA regula un conjunt de gens implicats en múltiples funcions [74] i que, la quinasa serina/treonina SnRK2 està implicada en el seu mecanisme d'acció, representat a la *figura 3*. ABA indueix la expressió de gens de la família *MYC*, que incrementen la tolerància a la sequera. El seu increment inhibeix la expressió dels gens *IPT 1,4,5,6 i 8*, lo que inhibeix alhora la via de biosíntesi de CKs. A més, s'ha vist que SnRK2 indueix la expressió dels ARR-A, que inhibeixen per regulació negativa la expressió dels ARR-B i, per tant, de la via de senyalització de les CKs. Per altra banda, s'ha vist que les AHPS indueixen la expressió de ARR1, 11 i 12 (ARR tipus B), que inhibeixen la SnRK2s i, per tant, la via de senyalització de ABA [75], per lo que, segons la evidència acumulada fins ara, s'ha vist que les CKs i ABA tenen una diafonia antagònica [10].

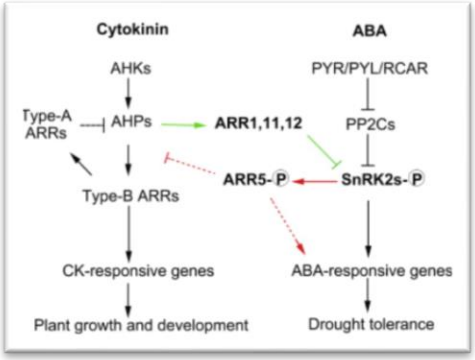


***Figura 3**. Model de treball per les interaccions SnRK2-ARR durant les respostes a l'estrès per sequera* [75] .

Cada cop són més els estudis que investiguen aquests elements de resposta, encara així, es necessita més evidència per la aplicació eficient de la biologia de la CK en la biotecnologia vegetal orientada a la tolerància a l'estrès.

2. EFECTES FISIOLÒGICS QUE DUEN A L'INCREMENT DE LA EFICIÈNCIA DELS CEREALS PER LES CKs EN CONDICIONS DE SEQUERA

Fins ara s'ha vist que la modificació dels nivells endògens de CKs són capaços d'incrementar la producció en els cereals mitjançant la regulació gènica de diferents gens. En aquest apartat es revisen les adaptacions a nivell fisiològic de planta que duen a l'increment de l'eficiència del cultiu amb la regulació dels nivells endògens de CK.

La modificació de la concentració de CKs endògenes influeix en l'equilibri hídric de la planta, la maquinària fotosintètica, el creixement de les plantes i la defensa antioxidant. Tots ells actuen de forma conjunta incrementant la tolerància a la sequera i la eficiència dels cultius de cereals.

2.1. Equilibri hídric en els cereals

La sequera produeix una disminució del contingut hídric de la planta. La millora en la gestió de la eficiència en la utilització d'aigua és essencial per poder incrementar la tolerància a l'estrès hídric, que es veu disminuït en condicions de sequera, com es mostra en la *figura 4 (A) i (B)*. Una manera de mantenir el contingut hídric és augmentar la seva captació per les arrels, creant un major sistema radicular, així com un increment en la mida de les arrels i disminuir les pèrdues per les parts aèries, lo que implica un major tancament estomàtic i, a la llarga, una disminució en la densitat estomàtica de les fulles. Aquest tancament, també està implicat en un subministrament limitat de diòxid de carboni,

substrat essencial per la realització de la fotosíntesi, lo que implica una disminució de la taxa fotosintètica, que es revisa en el següent apartat. Les CKs es troben implicades en la regulació del contingut hídric de la planta.

S'ha descrit que l'increment de la concentració endògena de CKs té com a conseqüència un increment del potencial hídric i una major eficiència en l'ús d'aigua en diferents famílies de plantes a través de la regulació de la conductància estomàtica i la seva densitat [76], [77], però manca la experimentació sobre el cultiu concret de cereals. Un estudi realitzat sobre plantes transgèniques d'arròs P_{SARK}*::IPT* crescudes en un hivernacle ha mostrat una disminució en la taxa relativa de la pèrdua d'aigua en els primers 5 dies d'estrès hídric en contraposició a les plantes control a mesura que augmentava la sequera, lo que implica un increment en la seva tolerància a la sequera, però no s'observaren canvis significatius en els dies posteriors [48], com es mostra en la *figura 4 (E).* No està clar si la disminució de la pèrdua d'aigua es deu a un tancament més ràpid dels estomes durant la sequera o existeixen altres mecanismes implicats.

Figura 4. *Adaptada de* [48]. *Efectes de l'estrès hídric sobre el creixement. (A) Plantes sense dèficit hídric. (B) Plantes sotmeses a 6 dies d'estrès hídric. (E) Taxa relativa de pèrdua d'aigua.*

L'increment de nivells endògens de CK mitjançant la expressió controlada de P_{SARK}*::IPT*, com en el cas anterior, sobre plantes de blat tropical (*Zea mays L.*) crescudes en un hivernacle, mostrà una millora a la tolerància de les plantes a l'estrès per sequera mitjançant una millora en el contingut hídric cel·lular de la planta durant un període de sequera de 3 setmanes, representat a la *figura 5*. A més, s'observaren canvis significatius en la millora de l'arquitectura de les arrels, representat a la *figura* 6 i en la millora de l'eficiència de producció del gra respecte les plantes control, de 44.3 g/planta en front al'1,43 g/planta de les plantes control [78].

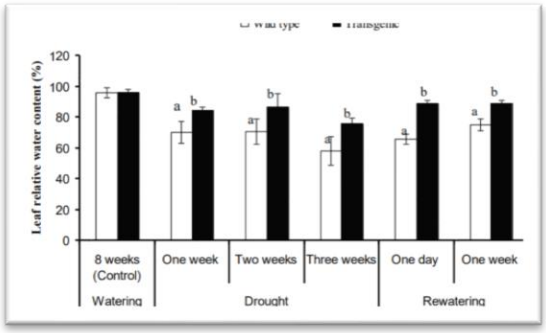


Figura 5. *Percentatge del contingut d'aigua relativa foliar en plantes control i transgèniques en diferents punts del tractament en hivernacle. Les barres blanques corresponen al control i les negres a les plantes transgèniques* P_{SARK}*::IPT* [78].

Figura 6*. Arquitectura de les arrels després del procés de regat/sequera/recuperació (15 setmanes) a (A) transgènic* P_{SARK}*::IPT i (B) plantes control* [78].

La resposta positiva de les CKs sobre l'equilibri hídric també podria estar relacionada amb la coordinació amb altres fitohormones com ABA i ET, implicades en la resposta a la sequera, com ja s'ha descrit en altres espècies de plantes [79], [80], [81]. El mecanisme de coordinació amb ABA podria ser mitjançant la quinasa serina/treonina SnRK2, com ja s'ha explicat anteriorment, mentre que el de ET encara es troba per dilucidar.

En tot cas, la bibliografia aporta proves de l'efecte positiu de les CKs sobre l'equilibri hídric de la planta, però el mecanisme implicat en la seva regulació pel cas dels cereals es troba encara, a dia d'avui, per descobrir, lo que podria ser, de nou, una nova línia d'investigació molt interessant per la aplicació biotecnològica de CKs sobre els cultius de cereals.

2.2. Maquinària fotosintètica

L'estrès abiòtic de la sequera afecta negativament a la taxa fotosintètica dels cereals. El dèficit hídric indueix el tancament estomàtic i una disminució en el contingut de clorofil·la, lo que condueix a un increment de la senescència foliar, relacionada amb la disminució de la producció del gra [82]. El tancament estomàtic és una resposta fisiològica de la planta, ja que els estomes juguen un paper primordial en el control de la pèrdua d'aigua i l'intercanvi de gasos en les fulles. La major part d'estudis realitzats han mostrat que durant el dèficit hídric, l'increment de la resistència estomàtica és el principal factor limitant de la fotosíntesi, encara que no l'únic [83],[84].

Estudis realitzats han mostrat que l'increment del contingut de CKs endògenes a les fulles poden millorar la taxa fotosintètica modulant la conductància estomàtica, la biosíntesi de clorofil·la i la seva degradació.

Un estudi realitzat sobre una varietat d'ordi crescudes en una cambra de creixement en condicions constants i amb aplicació de CK exògena, mostrà un increment significatiu en l'apertura dels estomes en plantes d'ordi tractades amb CK exògena en condicions de sequera en contraposició a les plantes a les quals no se'ls hi havia aplicat aquestes [85]. Un altre estudi realitzat *in vivo* amb aplicació de CKs exògena (BAP 40 µM) amb una polvorització foliar sobre plantes de blat mostrà un increment del 10 % en el contingut de clorofil·la en comparació al grup control sota condicions de sequera sense la aplicació exògena de CKs. A més, s'observà un increment del 22 % en la taxa fotosintètica en les plantes amb aplicació de CKs exògenes en condicions de sequera respecte les plantes sense aplicació de CKs exògenes en les mateixes condicions, lo que dugué a una millora en la tolerància a la sequera [86]. S'observà també un increment de la taxa fotosintètica en el cas de plantes de tabac transgèniques crescudes en un hivernacle, amb un increment en la expressió de P_{SARK}*::IPT*, promotor associat a la senescència. Però, en aquest cas no s'observaren canvis significatius en l'apertura estomàtica, lo que dóna suport a la idea que les CKs milloren la taxa fotosintètica mitjançant altres mecanismes no estomàtics, com l'increment de la biosíntesi de clorofil·la i la prevenció de la degradació de la maquinària fotosintètica. A més, una prova de PCR quantitativa, mostrà un increment en la transcripció de gens associats amb el fotosistema II (PS II), el citocrom B6, el fotosistema I (PS I), la NADH oxidoreductasa i el complexe ATP sintasa; resultats mostrats en la *figura 7* [87].

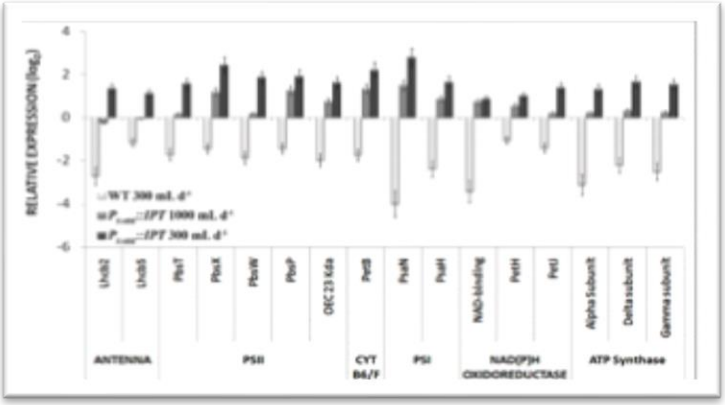


***Figura 7**. Expressió relativa del subconjunt de gens relacionats amb el fotosistema II (PS II), el citocrom B6, el fotosistema I (PS I), la NADH oxidoreductasa i el complexe ATP sintasa; mitjançant la validació de la expressió de microarrays per PCR quantitativa* [87].

Per altra banda, un estudi realitzat sobre plantes de blat de la varietat *Triticum aestivum* crescudes en un hivernacle i amb una aplicació exògena de CK, relacionà l'increment de la concentració de CK endògena amb la disminució de la degradació de clorofil·la, enlloc d'afectar a la seva biosíntesi [88].

Estudis més recents han posat de manifest que la resposta positiva de les CKs enfront la degradació de la maquinaria fotosintètica podria ser mitjançant la activació de la via dels brassinoesteroides (BR), fitohormones implicades en la resposta a la sequera [44], [89], [90]. La seva relació s'ha observat en plantes de tabac [87] i cogombre [91], però en cultius de cereals només s'ha descrit l'efecte positiu dels BR sobre l'estrès abiòtic causat per sequera però no s'ha estudiat el mecanisme subjacent a l'efecte de l'increment de CKs sobre els BR. La anàlisi de microarray de plantes transgèniques d'arròs amb sobreexpressió del gen P_{SARK}*::IPT* crescudes en un hivernacle ha mostrat que la expressió del gen *IPT* de síntesi de CKs endògenes té efectes positius en la expressió de gens associats a les vies biosintètiques, de regulació i resposta de BR, lo que indueix un increment en el contingut de clorofil·la i una disminució de la senescència [48]. A més, en un estudi *in vivo* realitzat sobre la varietat de blat *Triticum aestivum* es mostrà aquest afecte positiu sobre la sequera [92], però curiosament un altre estudi realitzat sobre plantes d'ordi mutants amb deficiència de BR crescudes en una cambra de creixement, mostrà que la modificació de la biosíntesi de BR en condicions de sequera no pareixen afectar a la concentració endògena de CKs ni al seu mecanisme d'acció en condicions de sequera [93]. Per tant, la relació entre les CKs i els BR podria ser una línia d'investigació interessant per veure el mecanisme d'acció de la aplicació de CKs exògenes sobre la maquinària fotosintètica independent del tancament estomàtic. A més, no es descarta la

modulació de la activitat fotosintètica de les CKs per altres mecanismes, lo que necessita també més investigació.

2.3. Creixement de la planta

En condicions de sequera disminueix el creixement de la tija, mentre que les arrels poden mantenir el seu creixement com a resposta adaptativa a la demanda d'aigua per part de la planta. Les CKs regulen el creixement de les plantes a través de modificacions morfològiques i metabòliques [94]. L'increment de CKs en les parts aèries poden incrementar una millora a la resposta a la sequera, mentre que la seva degradació en les arrels, indueixen un sistema radicular major i, per tant, la mateixa resposta positiva que en les parts aèries. De manera que, mentre que l'increment de CKs a zones específiques de la planta té una resposta positiva (les pars aèries), el seu increment a una altra regió, com són les arrels, indueixen una resposta negativa, demostrant així l'efecte pleiotròpic de les CKs en les plantes de cereals.

El creixement de la tija i les fulles s'incrementen amb l'increment de CKs endògenes, tant en fulles velles com en les més joves. Un estudi realitzat sobre plantes transgèniques d'arròs P_{SARK}*::IPT*, un promotor induït per estrès i maduració. Les plantes foren crescudes en un hivernacle i s'ha mostrat un increment de la concentració de CKs en les parts aèries, mentre que la seva concentració a les arrels romangué constant, modificant així la relació font/sumider. Com a conseqüència, les plantes mostraren una major tolerància a la sequera i un increment en la producció del gra [48]. Per altra banda, un estudi realitzat *in vitro* sobre plantes d'*Arabidpsis* transgèniques mitjançant la expressió de la CKX específica de les arrels mostrà que la disminució de la concentració de CKs específiques a les arrels induí la formació d'un sistema radicular més gran, mentre que el creixement i desenvolupament dels brots a les parts aèries, eren similars. Es documentà un increment en l'allargament de l'arrel primària, en la ramificació de les arrels i la formació de biomassa de les arrels fins un 60 % respecte el grup control [95]. A més, l'increment de la degradació de CKs en un estudi realitzat sobre plantes d'ordi transgènic de la varietat *Hordeum vulgari* crescudes en un hivernacle amb la expressió específica dels gens *CKX* a les arrels, mostrarà la producció d'un sistema d'arrels més gran i un enriquiment mineral en els brots, sobre tot de fòsfor, manganès i zinc. En conjunt, els resultats mostraren una millora en la tolerància a la sequera enfront el grup control [96].

Els resultats mostren que, tant l'increment de la síntesi de CKs en les parts aèries com la disminució de la seva concentració en les arrels, tenen un efecte positiu en la tolerància a la sequera dels cultius de cereals. A més, el darrer estudi esmentat, mostra l'efecte positiu a llarga distància de la modificació de la concentració de CKs en una regió concreta de la

planta (arrels) sobre les fulles. Els mecanismes implicats en la seva acció encara no es troben del tot dilucidats, poden implicar diverses vies de senyalització i la seva acció conjunta amb altres fitohormones, tal com l'auxina, ABA o l'ET [97]. Per lo que, de nou, es necessiten més estudis per veure el mecanisme d'actuació de les CKs a nivell bioquímic i poder veure possibles efectes secundaris a la utilització de CKs exògenes.

2.4. Defensa davant el dany oxidatiu

En condicions sequera, les espècies reactives d'oxigen (ROS) produïdes en els cloroplasts i les cadenes de transport d'electrons mitocondrials, s'acumulen en l'interior cel·lular. Actuen com a molècules de transducció de senyal que regulen diferents vies durant la aclimatació de la planta a l'estrès, però un increment en la seva concentració pot causar danys oxidatius importants a nivell de membranes (peroxidació lipídica), degradació proteica i danys en els nucleòtids en el pitjor dels casos [98], [99]; inclús poden arribar a conduir la destrucció oxidativa de la cèl·lula mitjançant l'estrès oxidatiu [100], [101]. Les CKs regulen la acumulació de ROS intracel·lular mitjançant dues vies diferents en els cultius de cereals: la inhibició d'enzims activats per l'increment de la concentració de ROS i l'activació d'enzims antioxidants.

S'han donat evidències que les CKs poden endarrerir en plantes de blat el dany oxidatiu augmentant el contingut de xantofil·les, implicades en la inhibició de la sobreexcitació de l'aparell fotosintètic, però es desconeix el mecanisme subjacent [102]. També s'han estudiat les correlacions entre l'efecte de les CKs i l'activitat dels enzims antioxidants i els pigments fotosintètics. S'ha descobert que la expressió ectòpica de CKX en plantes d'ordi transgènic sota el control d'un promotor específic de les arrels, altera l'arquitectura de les arrels i activa la via dels flavonoides, antioxidants no enzimàtics que participen en els mecanismes de tolerància a estrès per sequera [66]. En aquest cas, es veu una resposta positiva de la disminució de la concentració de CKs en un increment de la tolerància de les plantes de cereals a l'estrès per sequera.

A més, un estudi realitzat sobre plantes de blat de la varietat *Triticum aestivum* crescudes en un hivernacle i amb una aplicació exògena de CK, mostrà que la CK promou les activitats de la ascorbat peroxidasa (APX) i catalasa (CAT), lo que preserva la integritat del cloroplast durant la senescència [88]. Les seves activitats es mesuraren seguint els protocols de Jiménez et al. [43] i el mètode de Aebi [103], respectivament. Treballs realitzats sobre *A. thaliana* mostraren que la senescència disminueix la expressió d'algunes isoformes de APX, però que no afecta, o ho fa de manera tardana, sobre altres isoformes dels estromes dels cloroplasts [104]. Així doncs, es tracta d'una família de gens amb diversos membres, cada un d'ells amb una funció i regulació específica. L'efecte de

les CKs s'ha determinat de manera conjunta sobre la família, però encara queda per resoldre el seu mecanisme d'actuació i l'efecte de les CKs sobre cada una de les isoformes concretes.

Una vegada més, es dóna suport a la idea que les CKs actuen de manera diferent en funció del lloc i/o moment del desenvolupament. De manera global, pareix ser que protegeixen davant el dany oxidatiu en el cas concret dels cereals, però manca molta informació dels mecanismes d'acció i el seu efecte sobre altres molècules protectores, com pot ser altres enzims claus de les plantes que participen en la resposta antioxidant, tal com la deshidroascorbat reductasa (DHAR) o la glutatió reductasa (GR).

2.5. Modificació de la expressió gènica sensible a la sequera

En condicions d'estrès per sequera els gen sensibles a la sequera tenen un paper molt important en l'adaptació de les plantes de cereals. La modificació gènica o la aplicació de CKs exògenes poden potenciar un efecte positiu en el cas del cultiu de cereals. De fet, és molta la evidència aportada fins ara dels seus efectes positius sobre les plantes, però no s'ha d'oblidar que es tracta d'evidència de causa-efecte, sense dilucidar el mecanisme d'actuació, per lo menys no complet, pel cas concret dels cereals ni de les plantes en general. A més, a la llarga del treball s'ha anat comentant l'efecte pleiotòpic de les CKs, per lo que la regulació dels nivells de CKs en la planta podria tenir efectes secundaris a la llarga a les plantes encara desconeguts.

De fet, sí que s'han fet anàlisis sobre altres tipus de plantes com *A. Tumefaciens* que posen de manifest que la activació de la via de síntesi de CKs produeix una regulació de gens involucrats en diferents funcions biològiques com l'efecte antioxidant (catalasa), fotosíntesi (la subunitat gran de la RuBisCo), proteïnes transportadores de membrana (Receptor de repetició rica en leucina), metabolisme (precursor del cloroplast) i defensa contra l'estrès (proteïna 5327). A més de la modificació i degradació de certes proteïnes, RNA i respostes coordinades amb altres fitohormones com ABA, gibberel·lines (GA), auxina (IAA), àcid siàlic (SA), ET, jasmonat (JA) i BR [48], [105], [106]. També s'ha relacionat amb una disminució de la expressió dels gens que codifiquen per enzims implicats en la degradació de midó (isoamilasa III, fosforilasa de midó i precursor de l'α-amilasa) i un increment de la expressió dels gens relacionats amb la seva síntesi [107], lo que es correlacionà amb un increment de la quantitat de midó en les fulles [48].

Tots ells són gens importants en la adaptació de les plantes a l'estrès per sequera. En conjunt, es forma una xarxa de vies i mecanismes a les quals es troben implicades les CKs que, actualment, són desconegudes en la seva totalitat per nosaltres. Aquestes respostes no s'han observat totes encara en plantes de cereals, podria ser que en aquest cas concret

no es produïssin tots els efectes, però també pot ser que se'n produïssin d'altres que fins ara no s'han observat a models experimentals, per lo que és necessària més estudis científics que aportin evidència del mecanismes pels quals les CKs tenen un efecte positiu sobre el cultiu de cereals.

Conclusions

Després d'haver realitzat la recerca bibliogràfica, es pot concloure que:

1. Les CKs juguen un paper fonamental en la resposta a l'estrès per sequera.
2. Es demostra que la expressió constitutiva de CKs té efectes letals a causa de la naturalesa pleiotròpica de les CKs. L'increment de la concentració endògena de CKs a les parts aèries i la seva disminució en les arrels, té un efecte positiu en la millora de l'eficiència pel cas concret del cultiu de cereals. Per lo que la selecció del promotor utilitzat sobre el gen IPT és essencial pels efectes sobre la planta.
3. La regulació del nivell de CK en una zona determinada de la planta implica tota una sèrie de modificacions en la fisonomia de la planta, tant en les parts aèries, com en les arrels que tenen un efecte positiu sobre la eficiència de la producció en els cereals. Per lo que tenen efectes autocrins, paracrins i a llarga distància.
4. Les CKs tenen efectes sobre la expressió gènica de gens implicats en la resposta a la sequera, però es requereixen més assajos per dilucidar els gens que es troben afectats, així com la relació de la seva acció conjunta amb altres fitohormones.
5. De cara al futur, seria necessari l'estudi dels mecanismes d'acció subjacents a l'efecte positiu de les CKs sobre la producció. A més d'indagar en els efectes dels diferents membres que conformen cada família de gens implicats, tant com en la seva via de senyalització. Això aportarà una imatge detallada que podrà dur al desenvolupament de cultius tolerants a la sequera i, a la llarga, una agricultura més sostenible que pugui solucionar el problema de la maca de cereals predita pel 2050.
6. Finalment, fins ara s'ha estudiat l'efecte de l'increment del nivell de CK a les parts aèries mitjançant la expressió del gen IPT i el de la seva disminució a les arrels mitjançant la expressió del gen CKX, però un altra línia d'estudi podria ser la combinació d'ambdues per veure una possible acció sinèrgica de la resposta de les plantes de cereals en aquestes condicions.

Per tant, tot i la gran quantitat d'estudis, queden encara molts interrogants per resoldre respecte la regulació de CKs endògenes pel desenvolupament de cultius tolerants a la sequera. Un problema que, si no es resol, posarà a prova a la humanitat d'aquí a 30 anys.

Bibliografia

[1] D. Wallace-Wells and M. Pérez Sánchez, *El planeta inhóspito : la vida después del calentamiento*. 2019.

[2] W. Steffen, W. Broadgate, L. Deutsch, O. Gaffney, and C. Ludwig, "The trajectory of the anthropocene: The great acceleration," *Anthropocene Review*, vol. 2, no. 1. SAGE Publications Inc., pp. 81–98, 01-Apr-2015.

[3] "Definición de cambio climático - Diccionario del español jurídico - RAE." [Online]. Available: https://dej.rae.es/lema/cambio-climático. [Accessed: 01-May-2020].

[4] C.-O. Lead *et al.*, "Projections of Future Climate Change," 2001.

[5] B. D. Stocker *et al.*, "Multiple greenhouse-gas feedbacks from the land biosphere under future climate change scenarios," *Nat. Clim. Chang.*, vol. 3, no. 7, pp. 666–672, Jun. 2013.

[6] R. Mittler and E. Blumwald, "Genetic Engineering for Modern Agriculture: Challenges and Perspectives," *Annu. Rev. Plant Biol.*, vol. 61, no. 1, pp. 443–462, Jun. 2010.

[7] S. P. Long and D. R. Ort, "More than taking the heat: Crops and global change," *Current Opinion in Plant Biology*, vol. 13, no. 3. Elsevier Ltd, pp. 240–247, 2010.

[8] G. C. Nelson and International Food Policy Research Institute., *Climate change : impact on agriculture and costs of adaptation*. International Food Policy Research Institute, 2009.

[9] "abiótico, abiótica | Definición | Diccionario de la lengua española | RAE - ASALE." [Online]. Available: https://dle.rae.es/abiótico. [Accessed: 02-Jun-2020].

[10] N. N. Hai, N. N. Chuong, N. H. C. Tu, A. Kisiala, X. L. T. Hoang, and N. P. Thao, "Role and regulation of cytokinins in plant response to drought stress," *Plants*, vol. 9, no. 4. MDPI AG, p. 422, 01-Apr-2020.

[11] J. S. Boyer, "Plant productivity and environment," *Science (80-.).*, vol. 218, no. 4571, pp. 443–448, Oct. 1982.

[12] E. A. Bray, "Plant responses to water deficit," *Trends in Plant Science*, vol. 2, no. 2. Elsevier Ltd, pp. 48–54, 1997.

[13] J. R. Witcombe, P. A. Hollington, C. J. Howarth, S. Reader, and K. A. Steele, "Breeding for abiotic stresses for sustainable agriculture," *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, vol. 363, no. 1492. Royal Society, pp. 703–716, 27-Feb-2008.

[14] M. M. Chaves, J. P. Maroco, and J. S. Pereira, "Understanding plant responses to drought - From genes to the whole plant," *Functional Plant Biology*, vol. 30, no. 3. CSIRO PUBLISHING, pp. 239–264, 2003.

[15] H. B. Shao, L. Y. Chu, C. A. Jaleel, and C. X. Zhao, "Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants," *Comptes Rendus - Biologies*, vol. 331, no. 3. No longer published by Elsevier, pp. 215–225, 01-Mar-2008.

[16] B. Huang and H. Gao, "Physiological Responses of Diverse Tall Fescue Cultivars to Drought Stress," *HORTSCIENCE*, vol. 34(5), pp. 897–901, 1999.

[17] M. Nadeem *et al.*, "Research Progress and Perspective on Drought Stress in Legumes: A Review," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, no. 10, p. 2541, May 2019.

[18] A. F. E. K. Amine, N.H Baba, M. Belhadj, M. Deurenberg, *Dieta, nutrición y prevención de enfermedades crónicas - World Health Organization-*. Ginebra, 1999.

[19] D. K. Ray, N. D. Mueller, P. C. West, and J. A. Foley, "Yield Trends Are Insufficient to Double Global Crop Production by 2050," *PLoS One*, vol. 8, no. 6, Jun. 2013.

[20] D. S. Battisti and R. L. Naylor, "Historical warnings of future food insecurity with unprecedented seasonal heat," *Science (80-.).*, vol. 323, no. 5911, pp. 240–244, Jan. 2009.

[21] "Expert meeting on How to Feed the World in 2050. FAO headquarters, 24-26 June 2009." [Online]. Available: http://www.fao.org/3/ak542e/ak542e00.htm. [Accessed: 29-May-2020].

[22] D. B. Lobell, M. B. Burke, C. Tebaldi, M. D. Mastrandrea, W. P. Falcon, and R. L. Naylor, "Prioritizing climate change adaptation needs for food security in 2030," *Science (80-.).*, vol. 319, no. 5863, pp. 607–610, Feb. 2008.

[23] L. Shen *et al.*, "Measuring stress signaling responses of stomata in isolated epidermis of graminaceous species," *Front. Plant Sci.*, vol. 6, no. JULY, p. 533, Jul. 2015.

[24] Z. H. Chen *et al.*, "Molecular Evolution of Grass Stomata," *Trends in Plant Science*, vol. 22, no. 2. Elsevier Ltd, pp. 124–139, 01-Feb-2017.

[25] S. J. Sun *et al.*, "Protein kinase OsSAPK8 functions as an essential activator of S-type anion channel OsSLAC1, which is nitrate-selective in rice," *Planta*, vol. 243, no. 2, pp. 489–500, Feb. 2016.

[26] K. Kusumi, A. Hashimura, Y. Yamamoto, J. Negi, and K. Iba, "Contribution of the S-type Anion Channel SLAC1 to Stomatal Control and Its Dependence on Developmental Stage in Rice.," *Plant Cell Physiol.*, vol. 58, no. 12, pp. 2085–2094, Dec. 2017.

[27] M. T. Raissig *et al.*, "Mobile MUTE specifies subsidiary cells to build physiologically improved grass stomata," *Science (80-.).*, vol. 355, no. 6330, pp. 1215–1218, Mar. 2017.

[28] N. Schäfer *et al.*, "A Tandem Amino Acid Residue Motif in Guard Cell SLAC1 Anion Channel of Grasses Allows for the Control of Stomatal Aperture by Nitrate," *Curr. Biol.*, vol. 28, no. 9, pp. 1370-1379.e5, May 2018.

[29] M. Peña-Gallardo *et al.*, "Response of crop yield to different time-scales of drought in the United States: Spatio-temporal patterns and climatic and environmental drivers," *Agric. For. Meteorol.*, vol. 264, pp. 40–55, Jan. 2019.

[30] T. R. Wheeler, G. R. Batts, R. H. Ellis, P. Hadley, and J. I. L. Morison, " Growth and yield of winter wheat (Triticum aestivum) crops in response to CO 2 and temperature ," *J. Agric. Sci.*, vol. 127, no. 1, pp. 37–48, Aug. 1996.

[31] R. FERRIS, "Effect of High Temperature Stress at Anthesis on Grain Yield and Biomass of Field-grown Crops of Wheat," *Ann. Bot.*, vol. 82, no. 5, pp. 631–639, Nov. 1998.

[32] D. B. Lobell, W. Schlenker, and J. Costa-Roberts, "Climate trends and global crop production since 1980," *Science (80-.).*, vol. 333, no. 6042, pp. 616–620, Jul. 2011.

[33] J. J. Kieber and G. E. Schaller, “Cytokinins,” *Arab. B.*, vol. 12, p. e0168, Jan. 2014.
[34] W. G. Brenner and T. Schmülling, “Transcript profiling of cytokinin action in Arabidopsis roots and shoots discovers largely similar but also organ-specific responses,” *BMC Plant Biol.*, vol. 12, Jul. 2012.
[35] T. Werner, V. Motyka, V. Laucou, R. Smets, H. Van Onckelen, and T. Schmülling, “Cytokinin-Deficient Transgenic Arabidopsis Plants Show Multiple Developmental Alterations Indicating Opposite Functions of Cytokinins in the Regulation of Shoot and Root Meristem Activity,” *Plant Cell*, vol. 15, no. 11, pp. 2532–2550, Nov. 2003.
[36] D. S. Letham, “Cytokinins from Zea mays,” *Phytochemistry*, vol. 12, no. 10, pp. 2445–2455, Oct. 1973.
[37] Y. F. Sun, S. J., Qi, G. N., Gao, Q. F., Wang, H. Q., Yao, F. Y., Hussain, J., & Wang, “Protein kinase OsSAPK8 functions as an essential activator of S-type anion channel OsSLAC1, which is nitrate-selective in rice,” *Planta*, vol. 243(2), pp. 489–500, 2016.
[38] M. Jordán and J. Casaretto, “Capítulo XV Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citocininas,” 2006.
[39] K. Miyawaki *et al.*, “Roles of Arabidopsis ATP/ADP isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 103, no. 44, pp. 16598–16603, Oct. 2006.
[40] J. Azcón Bieto and M. Talón, *Fundamentos de fisiología vegetal / coord. J. Azcón-Bieto, M. Talón*. McGraw-Hill, 2008.
[41] A. P. Mähönen *et al.*, “Cytokinins Regulate a Bidirectional Phosphorelay Network in Arabidopsis,” *Curr. Biol.*, vol. 16, no. 11, pp. 1116–1122, Jun. 2006.
[42] K. Caesar *et al.*, “Evidence for the localization of the Arabidopsis cytokinin receptors AHK3 and AHK4 in the endoplasmic reticulum | Journal of Experimental Botany | Oxford Academic,” *J. Exp. Bot.*, vol. 62, no. 15, pp. 5571–5580, 2011.
[43] A. Jiménez, J. A. Hernández, L. A. Del Río, and F. Sevilla, “Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves,” *Plant Physiol.*, vol. 114, no. 1, pp. 275–284, May 1997.
[44] G. A. Romanov, S. N. Lomin, and T. Schmülling, “Cytokinin signaling: from the ER or from the PM? That is the question!,” *New Phytol.*, vol. 218, no. 1, pp. 41–53, Apr. 2018.
[45] A. P. Mähönen *et al.*, “Cytokinin signaling and its inhibitor AHP6 regulate cell fate during vascular development,” *Science (80-.).*, vol. 311, no. 5757, pp. 94–98, Jan. 2006.
[46] S. Munné-Bosch and L. Alegre, “Die and let live: Leaf senescence contributes to plant survival under drought stress,” *Functional Plant Biology*, vol. 31, no. 3. CSIRO PUBLISHING, pp. 203–216, 2004.
[47] R. S. Gujjar and K. Supaibulwatana, “The mode of cytokinin functions assisting plant adaptations to osmotic stresses,” *Plants*, vol. 8, no. 12. MDPI AG, p. 542, 01-Dec-2019.
[48] Z. Peleg, M. Reguera, E. Tumimbang, H. Walia, and E. Blumwald, “Cytokinin-mediated source/sink modifications improve drought tolerance and increase grain yield in rice under water-stress,” *Plant Biotechnol. J.*, vol. 9, no. 7, pp. 747–758, Sep. 2011.
[49] M. Reguera, Z. Peleg, Y. M. Abdel-Tawab, E. B. Tumimbang, C. A. Delatorre, and E. Blumwald, “Stress-induced cytokinin synthesis increases drought tolerance through the coordinated regulation of carbon and nitrogen assimilation in rice,” *Plant Physiol.*, vol. 163, no. 4, pp. 1609–1622, Dec. 2013.
[50] H. Chang, M. L. Jones, G. M. Banowetz, and D. G. Clark, “Overproduction of cytokinins in petunia flowers transformed with P SAG12-IPT delays corolla senescence and decreases sensitivity to ethylene,” *Plant Physiol.*, vol. 132, no. 4, pp. 2174–2183, Aug. 2003.
[51] N. Brugière, S. Humbert, N. Rizzo, J. Bohn, and J. E. Habben, “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.*, vol. 67, no. 3, pp. 215–229, Jun. 2008.
[52] M. Tan *et al.*, “Identification and expression analysis of the IPT and CKX gene families during axillary bud outgrowth in apple (Malus domestica Borkh.),” *Gene*, vol. 651, pp. 106–117, Apr. 2018.
[53] Y. C. Tsai *et al.*, “Characterization of genes involved in cytokinin signaling and metabolism from rice,” *Plant Physiol.*, vol. 158, no. 4, pp. 1666–1684, Apr. 2012.
[54] P. R. H. Robson *et al.*, “Leaf senescence is delayed in maize expressing the Agrobacterium IPT gene under the control of a novel maize senescence-enhanced promoter,” *Plant Biotechnol. J.*, vol. 2, no. 2, pp. 101–112, Feb. 2004.
[55] B. Sykorová *et al.*, “Senescence-induced ectopic expression of the A. tumefaciens ipt gene in wheat delays leaf senescence, increases cytokinin content, nitrate influx, and nitrate reductase activity, but does not affect grain yield.,” *J. Exp. Bot.*, vol. 59, no. 2, pp. 377–87, 2008.
[56] P. R. H. Robson *et al.*, “Leaf senescence is delayed in maize expressing the Agrobacterium IPT gene under the control of a novel maize senescence-enhanced promoter,” *Plant Biotechnol. J.*, vol. 2, no. 2, pp. 101–112, Feb. 2004.
[57] H. Jiang *et al.*, “Molecular cloning and function analysis of the stay green gene in rice,” *Plant J.*, vol. 52, no. 2, pp. 197–209, Oct. 2007.
[58] J. T. Christopher, M. J. Christopher, A. K. Borrell, S. Fletcher, and K. Chenu, “Stay-green traits to improve wheat adaptation in well-watered and water-limited environments.,” *J. Exp. Bot.*, vol. 67, no. 17, pp. 5159–72, 2016.
[59] Y. H. Lin, E. Ludlow, R. Kalla, C. Pallaghy, M. Emmerling, and G. Spangenberg, “Organ-specific, developmentally-regulated and abiotic stress-induced activities of four Arabidopsis thaliana promoters in transgenic white clover (Trifolium repens L.),” *Plant Sci.*, vol. 165, no. 6, pp. 1437–1444, Dec. 2003.
[60] A. Ghosh, M. N. A. Shah, Z. S. Jui, S. Saha, K. A. Fariha, and T. Islam, “Evolutionary variation and expression profiling of Isopentenyl transferase gene family in Arabidopsis thaliana L. and Oryza sativa L.,” *Plant Gene*, vol. 15, pp. 15–27, Sep. 2018.
[61] T. Kiba, Y. Takebayashi, M. Kojima, and H. Sakakibara, “Sugar-induced de novo cytokinin biosynthesis contributes to Arabidopsis growth under elevated CO2,” *Sci. Rep.*, vol. 9, no. 1, pp. 1–15, Dec. 2019.
[62] D. W. Mok and M. C. Mok, “CYTOKININ METABOLISM AND ACTION,” *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, vol. 52, no. 1, pp. 89–118, Jun. 2001.

[63] L. Chen, J. Zhao, J. Song, and P. E. Jameson, "Cytokinin dehydrogenase: a genetic target for yield improvement in wheat," *Plant Biotechnology Journal*, vol. 18, no. 3. Blackwell Publishing Ltd, pp. 614–630, 01-Mar-2020.
[64] T. Werner *et al.*, "Root-specific reduction of cytokinin causes enhanced root growth, drought tolerance, and leaf mineral enrichment in Arabidopsis and tobacco," *Plant Cell*, vol. 22, no. 12, pp. 3905–3920, Dec. 2010.
[65] H. Pospíšilová *et al.*, "Transgenic barley overexpressing a cytokinin dehydrogenase gene shows greater tolerance to drought stress," *N. Biotechnol.*, vol. 33, no. 5, pp. 692–705, Sep. 2016.
[66] P. Vojta *et al.*, "Whole transcriptome analysis of transgenic barley with altered cytokinin homeostasis and increased tolerance to drought stress," *N. Biotechnol.*, vol. 33, no. 5, pp. 676–691, Sep. 2016.
[67] K. Mrízova *et al.*, "Overexpression of cytokinin dehydrogenase genes in barley (Hordeum vulgare cv. Golden Promise) fundamentally affects morphology and fertility," *PLoS One*, vol. 8, no. 11, Nov. 2013.
[68] L. S. P. Tran *et al.*, "Functional analysis of AHK1/ATHK1 and cytokinin receptor histidine kinases in response to abscisic acid, drought, and salt stress in Arabidopsis," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 104, no. 51, pp. 20623–20628, Dec. 2007.
[69] S. Javadmanesh, F. Rahmani, and L. Pourakbar, "Effect of abiotic stresses on Histidine kinases gene expression," *J. Stress Physiol. Biochem.*, vol. 9, no. 1, pp. 124–135, 2013.
[70] K. H. Nguyen *et al.*, "Arabidopsis type B cytokinin response regulators ARR1, ARR10, and ARR12 negatively regulate plant responses to drought," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 113, no. 11, pp. 3090–3095, Mar. 2016.
[71] J. I. Medford, R. Horgan, Z. El-Sawi, and H. J. Klee, "Alterations of Endogenous Cytokinins in Transgenic Plants Using a Chimeric Isopentenyl Transferase Gene.," *Plant Cell*, vol. 1, no. 4, pp. 403–413, Apr. 1989.
[72] N. Hirose, N. Makita, M. Kojima, T. Kamada-Nobusada, and H. Sakakibara, "Overexpression of a Type-A Response Regulator Alters Rice Morphology and Cytokinin Metabolism," *Plant Cell Physiol.*, vol. 48, no. 3, pp. 523–539, Mar. 2007.
[73] Y. Zhou *et al.*, "A novel ABA functional analogue B2 enhances drought tolerance in wheat," *Sci. Rep.*, vol. 9, no. 1, pp. 1–9, Dec. 2019.
[74] K. Vishwakarma *et al.*, "Abscisic acid signaling and abiotic stress tolerance in plants: A review on current knowledge and future prospects," *Frontiers in Plant Science*, vol. 8. Frontiers Research Foundation, p. 161, 20-Feb-2017.
[75] X. Huang *et al.*, "The Antagonistic Action of Abscisic Acid and Cytokinin Signaling Mediates Drought Stress Response in Arabidopsis," *Mol. Plant*, vol. 11, no. 7, pp. 970–982, Jul. 2018.
[76] M. Farber, Z. Attia, and D. Weiss, "Cytokinin activity increases stomatal density and transpiration rate in tomato," *J. Exp. Bot.*, vol. 67, no. 22, pp. 6351–6362, 2016.
[77] L. Hu, Z. Wang, and B. Huang, "Effects of Cytokinin and Potassium on Stomatal and Photosynthetic Recovery of Kentucky Bluegrass from Drought Stress," *Crop Sci.*, vol. 53, no. 1, pp. 221–231, Jan. 2013.
[78] T. B. Leta *et al.*, "Drought tolerant tropical maize (Zea mays L.) developed through genetic transformation with isopentenyltransferase gene," *African J. Biotechnol.*, vol. 15, no. 43, pp. 2447–2464, Oct. 2016.
[79] D. T. Le *et al.*, "Identification and expression analysis of Cytokinin metabolic genes in soybean under normal and drought conditions in relation to Cytokinin levels," *PLoS One*, vol. 7, no. 8, Aug. 2012.
[80] R. Nishiyama *et al.*, "Analysis of cytokinin mutants and regulation of cytokinin metabolic genes reveals important regulatory roles of cytokinins in drought, salt and abscisic acid responses, and abscisic acid biosynthesis," *Plant Cell*, vol. 23, no. 6, pp. 2169–2183, Jun. 2011.
[81] W. Li, L. Herrera-Estrella, and L. S. P. Tran, "The Yin-Yang of Cytokinin Homeostasis and Drought Acclimation/Adaptation," *Trends in Plant Science*, vol. 21, no. 7. Elsevier Ltd, pp. 548–550, 01-Jul-2016.
[82] S. Basu, V. Ramegowda, A. Kumar, and A. Pereira, "Plant adaptation to drought stress [version 1; referees: 3 approved]," *F1000Research*, vol. 5. Faculty of 1000 Ltd, p. 1554, 30-Jun-2016.
[83] I. . Chernyad'ev, "Plant Photosynthesis under Conditions of Water Stress and the Protective Effect of Cytokinins: A Review," *Appl. Biochem. Microbiol.*, vol. 33, no. 1, pp. 15–17, 1997.
[84] A. WINGLER, W. P. QUICK, R. A. BUNGARD, K. J. BAILEY, P. J. LEA, and R. C. LEEGOOD, "The role of photorespiration during drought stress: an analysis utilizing barley mutants with reduced activities of photorespiratory enzymes," *Plant, Cell Environ.*, vol. 22, no. 4, pp. 361–373, Apr. 1999.
[85] O. N. Kulaeva *et al.*, "Chloroplasts affect the leaf response to cytokinin," *J. Plant Physiol.*, vol. 159, no. 12, pp. 1309–1316, Dec. 2002.
[86] S. Dwivedi, S. Kumar, S. Mondal, N. Malviya, and R. Dubey, "Physiological Basis of Cytokinin induced Drought Tolerance in Wheat (Triticum aestivum L.)," *J. AgriSearch*, vol. 1, no. 3, pp. 149–144, 2014.
[87] R. M. Rivero, J. Gimeno, A. Van Deynze, H. Walia, and E. Blumwald, "Enhanced Cytokinin Synthesis in Tobacco Plants Expressing PSARK::IPT Prevents the Degradation of Photosynthetic Protein Complexes During Drought," *Plant Cell Physiol.*, vol. 51, no. 11, pp. 1929–1941, Nov. 2010.
[88] H. A. Zavaleta-Mancera *et al.*, "Cytokinin promotes catalase and ascorbate peroxidase activities and preserves the chloroplast integrity during dark-senescence," *J. Plant Physiol.*, vol. 164, no. 12, pp. 1572–1582, Dec. 2007.
[89] F. Morell, A. Hernández, Y. Borges, and F. Marentes, "Arbuscular mycorhizal fungal activity on soil structure," *Cultiv. Trop.*, vol. 30, no. 4, pp. 00–00, 2009.
[90] C. Dockter *et al.*, "Induced variations in brassinosteroid genes define barley height and sturdiness, and expand the green revolution genetic toolkit," *Plant Physiol.*, vol. 166, no. 4, pp. 1912–1927, Dec. 2014.
[91] X. J. Xia *et al.*, "Brassinosteroids promote photosynthesis and growth by enhancing activation of Rubisco and expression of photosynthetic genes in Cucumis sativus," *Planta*, vol. 230, no. 6, pp. 1185–1196, Nov. 2009.
[92] F. Shakirova *et al.*, "Involvement of dehydrins in 24-epibrassinolide-induced protection of wheat plants against drought stress," *Plant Physiol. Biochem.*, vol. 108, pp. 539–548, Nov. 2016.
[93] D. Gruszka, A. Janeczko, M. Dziurka, E. Pociecha, J. Oklestkova, and I. Szarejko, "Barley Brassinosteroid Mutants Provide an Insight into Phytohormonal Homeostasis in Plant Reaction to Drought Stress," *Front. Plant Sci.*, vol. 7, no. DECEMBER2016, p. 1824, Dec. 2016.

[94] B. Barnabás, K. Jäger, and A. Fehér, "The effect of drought and heat stress on reproductive processes in cereals," *Plant, Cell Environ.*, vol. 31, no. 1, pp. 11–38, Jan. 2008.
[95] T. Werner *et al.*, "Root-specific reduction of cytokinin causes enhanced root growth, drought tolerance, and leaf mineral enrichment in Arabidopsis and tobacco," *Plant Cell*, vol. 22, no. 12, pp. 3905–3920, Dec. 2010.
[96] E. Ramireddy *et al.*, "Root engineering in barley: Increasing cytokinin degradation produces a larger root system, mineral enrichment in the shoot and improved drought tolerance," *Plant Physiol.*, vol. 177, no. 3, pp. 1078–1095, Jun. 2018.
[97] I. H. Street *et al.*, "Cytokinin acts through the auxin influx carrier AUX1 to regulate cell elongation in the root," *Dev.*, vol. 143, no. 21, pp. 3982–3993, Nov. 2016.
[98] V. Demidchik, "Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology," *Environmental and Experimental Botany*, vol. 109. Elsevier, pp. 212–228, 01-Jan-2015.
[99] V. B. Tognetti, A. Bielach, and M. Hrtyan, "Redox regulation at the site of primary growth: auxin, cytokinin and ROS crosstalk," *Plant. Cell Environ.*, vol. 40, no. 11, pp. 2586–2605, Nov. 2017.
[100] R. Mittler, "Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance," *Trends in Plant Science*, vol. 7, no. 9. Elsevier, pp. 405–410, 01-Sep-2002.
[101] F. K. Choudhury, R. M. Rivero, E. Blumwald, and R. Mittler, "Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination," *Plant J.*, vol. 90, no. 5, pp. 856–867, Jun. 2017.
[102] A. Vlckova, M. Spundova, E. Kotabova, R. Novotny, K. Dolezal, and J. Naus, "Protective cytokinin action switches to damaging during senescence of detached wheat leaves in continuous light," *Physiol. Plant.*, vol. 126, no. 2, pp. 257–267, Feb. 2006.
[103] H. Aebi, "[13] Catalase in Vitro," *Methods Enzymol.*, vol. 105, no. C, pp. 121–126, Jan. 1984.
[104] I. I. Panchuk, U. Zentgraf, and R. A. Volkov, "Expression of the Apx gene family during leaf senescence of Arabidopsis thaliana," *Planta*, vol. 222, no. 5, pp. 926–932, Nov. 2005.
[105] E. Merewitz, Y. Xu, and B. Huang, "Differentially expressed genes associated with improved drought tolerance in creeping bentgrass overexpressing a gene for cytokinin biosynthesis," *PLoS One*, vol. 11, no. 11, Nov. 2016.
[106] Y. Xu and B. Huang, "Transcriptional factors for stress signaling, oxidative protection, and protein modification in ipt-transgenic creeping bentgrass exposed to drought stress," *Environ. Exp. Bot.*, vol. 144, pp. 49–60, Dec. 2017.
[107] F. F. Fu and H. W. Xue, "Coexpression analysis identifies rice starch regulator1, a rice AP2/EREBP family transcription factor, as a novel rice starch biosynthesis regulator," *Plant Physiol.*, vol. 154, no. 2, pp. 927–938, Oct. 2010.