

**Artificial Induction by Potassium Chlorate of
“Off Season” Floral Induction in Longan
(*Dimocarpus longan* Lour.) Trees and
the Participation of Phytohormones**

Parichart Potchanasin

Stuttgart · 2008

Summary

Longan (*Dimorcarpus longan* Lour.) is a tropical/subtropical tree fruit and is recognized as an important tradable product of Thailand. Nowadays Thailand is the main exporter of this fruit worldwide. Normally, longan trees require an appropriate low temperatures (LT) interval to induce effective floral induction (FI). However, due to the uncontrollable temperatures under open field cultivation, alternatives such as mechanical and chemical procedures are attractive options to manipulate flowering. The potassium chlorate (KClO_3) is one of them which were accidentally discovered by its ability to induce FI at almost any time and temperature during the year. Therefore, application of KClO_3 opens the possibility to produce 'off-season' longan fruit, overcoming the restriction to a single harvest time and the uncertainty of insufficient low temperature situation the main reason for irregular fruit bearing. The method, therefore offers the farmer a higher and more stable income.

Recently, this method is widely used in many longan production areas especially in Thailand. Although this technique has long been found and developed an understanding of its "mode of action" is still very limited. Also, the role of mature leaves as an essential factor for LT as well as KClO_3 efficiency in FI is still unclear. Therefore, this study has been focused on the investigation of the regulatory mechanisms, hormonal as well as others, possibly involved in the process of longan FI. It is expected that the investigations will contribute to a more holistic understanding of the mechanisms that control FI in longan. In addition, the results are expected to provide some solutions to improve the "off season" FI method and, if possible, to convey the knowledge to other fruit species.

The experiments were conducted under two conditions – green-house and open field. Green-house experiments were carried out at the University of Hohenheims Versuchsstation, while open field experiments were performed at the Experimental station of Maejo University, Chiang Mai, Thailand. Low temperature ($\leq 18^{\circ}\text{C}$), girdling and defoliation and KClO_3 were used as flowering inductive treatments. Shoot apical buds (SAB) and the first terminal internode above the girdle were collected and frozen immediately in liquid nitrogen and freeze-dried. Afterwards, the SAB were excised and the bark peeled off from the wood. The SAB is the side where FI occurs and the bark of this material certainly contains phloem translocated and the wood xylem translocated hormones. All three materials were stored at -20°C until extraction and purification by a combination of PVP, DEAE-Sephadex A-25 column and C_{18} Sep-Pak cartridges. After that, endogenous hormones, viz. auxin (IAA), gibberellins (GAs), zeatin/zeatin-riboside (Z/ZR)- and isopentenyl adenine/ isopentenyl adenosine (iP/iPA)- type cytokinins (CKs) were quantified by Radioimmunoassay (RIA).

From the results of the controlled green-house experiments, it was possible to conclude that the flower-inducing treatment of longan trees by LT- and KClO_3 did not only cause FI but also changes in particular hormones during the FI period. Similarities between LT- and KClO_3 - treatments were observed in GA- and IAA- concentrations which, when compared to the non-inductive control treatment, declined significantly at later stages of the experimental period in the SAB. These two treatments also considerably stimulated Z/ZR and iP/iPA- type CKs in SAB as well as in wood and bark again compared to the control. Dissimilarity of hormonal changes were caused by a strong LT induced leaf export of iP- type CKs and IAA which was inhibited by KClO_3 treatment. In the open-field experiments, KClO_3 application had almost no effect on GA concentrations in receptive apical meristems whereas at the beginning IAA decreased but later remarkably increased. Interestingly, the requirement for

leaves provided some significant results: (i) almost 100% FI occurred by the application of KClO_3 but only in the presence of leaves, (ii) a strong increase of both CKs, particularly Z/ZR-CKs, in SAB occurred after KClO_3 +leave treatment; (iii) a significant difference between Z- and iP-type CKs on leaf dependency was found in subapical wood and bark tissue. iP/iPA-CKs accumulated even in the absence of leaves whether they had been treated with KClO_3 or not. On the other hand Z/ZR accumulated only in the presence of leaves and KClO_3 treatment.

From these results it can be concluded that KClO_3 induces 'off-season' flowering in longan trees via a similar hormonal mechanisms as after natural (LT) floral induction. However, a comparison between iP/iPA and Z/ZR-CKs in the defoliation experiment indicated that the former CKs accumulated in the absence of leaves whereas Z/ZR accumulation required leaves. This could be one of the decisive steps by which KClO_3 induces FI, besides its possible involvement in the provision of the necessary precursor molecule iP/iPA. Under natural FI by LT, the iP/iPA precursor for Z/ZR seems to be provided by leaves. This is not the case after KClO_3 treatment. The most logical conclusion would be that the final synthesis of Z-type CKs from iP/iPA is catalyzed from a leaf derived enzyme or another substance (Co-factor?) which is produced/exported as a response to LT as well as KClO_3 . Therefore in the absence of leaves iP-CKs accumulate because they are not used for Z-type CK biosynthesis. All of our experiments finally showed that without the accumulation of these Z/ZR CKs in the SAB no FI occurred, making this class of hormones the most probable and potent candidate in LT as well as KClO_3 induced FI in longan.

Zusammenfassung

Früchte des Longan (*Dimocarpus longan*, Lour) Baumes sind in S.-O. Asien weit verbreitet und bei Konsumenten sehr beliebt. Sie stellen ein wichtiges Handelsprodukt dar und Thailand ist der z.Z. weltgrößte Exporteur dieser Früchte. Als subtropischer Baum benötigt Longan niedrige Temperaturen (ca. 12 bis 18°C) für eine ausreichende Blüteninduktion (BI). Diese sind jedoch bei normalem Feldanbau aufgrund unkontrollierbarer Umweltbedingungen oft nicht gegeben und beschränken sich außerdem auf die kühle Jahreszeit. Als Folge sind nur während eines kurzen Zeitraums Longanfrüchte auf dem Markt, obwohl vom Klima her gesehen diese fast während des ganzen Jahres produziert werden könnten. Versuche die erforderliche BI auf andere Weise zu ermöglichen sind daher bei Longan und anderen subtropischen Früchten Legion, meistens jedoch mit bescheidenem Erfolg. Die zufällige Beobachtung eines thailändischen Farmers, dass Kaliumchlorat ($KClO_3$) BI bei Longan auch bei höheren Temperaturen induzieren kann und damit eine nahezu ganzjährige Produktion ermöglicht, hat unter Farmern wie Wissenschaftlern großes Aufsehen erregt. Aus vielerlei Gründen ermöglicht dieses Verfahren große Möglichkeiten die physiologischen und molekularbiologischen Regulationsvorgänge der BI bei Bäumen nun wesentlich intensiver zu untersuchen, womit der Longan Baum zu einem Art "Modellbaum" für derartige Untersuchungen werden könnte.

Die hier vorgestellten Experimente wurden sowohl unter kontrollierbaren Umweltbedingungen (Gewächshausversuche) in Hohenheim, als auch in Freilandversuchen in Chiang Mai (Thailand) durchgeführt und konzentrierten sich auf die Frage, ob niedrige Temperaturen bzw. $KClO_3$ -Behandlungen die BI auf ähnliche oder sogar identische Weise

induzieren. Da bekannt ist, dass Pflanzenhormone bei der Regulation der BI von Bäumen eine große Rolle spielen wurden die Auswirkungen von niedriger Temperatur bzw. KClO_3 auf die wahrscheinlich am meisten relevanten Hormone Indolyllessigsäure (IAA), Gibberelline (GAs) und Cytokinine (Z/ZR und iP/iPA) beschränkt. Die Gewächshaus-Versuche zeigten, dass bei Temperaturen über 20°C keine BI stattfand, bei Temperaturen zwischen 12 und 18°C aber nahezu 100% Blütenbildung erfolgte. Die Applikation von Kaliumchlorat über den Boden ermöglichte Blütenbildung aber auch bei Temperaturen deutlich über 20°C . Die hormonellen Veränderungen, die während dieses Versuches festgestellt wurden zeigten, dass die Konzentrationen von IAA und GAs in den apikalen "Knospen" nach beiden Behandlungen zunächst kurz anstiegen um dann jedoch unter die "Kontrollwerte" der über 20°C Variante abzufallen. Dies bestätigte zunächst die Hypothese, dass diese beiden Hormone bei Bäumen eine BI-hemmende Funktion haben könnten, eine Hypothese, die sich in weiteren Versuchen jedoch nicht immer belegen ließ. Ein sehr eindeutiges Ergebnis ergab sich jedoch bei der Gruppe der Cytokinine und hier vor allem bei Zeatin und seinem Ribosid (Z und ZR). Diese wurden durch niedrige Temperaturen und KClO_3 Behandlung deutlich, bei weitem Versuchen in Thailand oft sogar drastisch erhöht. Diese Cytokinin-Erhöhung fand sich nicht nur in den apikalen Knospen, dem eigentlichen Ort der BI, sondern auch in subapikalen Sprosssteilen und teilweise in den Blättern. Da Blätter, ähnlich wie niedrige Temperaturen, eine essentielle Rolle bei der BI spielen und KClO_3 , anders als bei der Temperatur, diese Funktion nicht ersetzen kann, wurde sowohl in den Gewächshaus- wie in den Freiländerversuchen intensive Analysen der Hormonkonzentrationen in den Blättern und des Hormontransports aus den Blättern durchgeführt. Diese Versuche ergaben einige erwartete und einige unerwartete Ergebnisse. Sowohl niedrige Temperaturen wie KClO_3 Behandlungen zeigten keine BI, wenn die Blätter

eines Triebes entfernt und dieser Trieb durch Ringelung (Phloemunterbrechung) vom Rest des Baumes "isoliert" wurde. Daraus wurde geschlossen, dass die Blätter eine Substanz exportieren, die in der apikalen Knospe für die BI erforderlich ist. Die Analysen ergaben, dass die Blätter alle analysierten Hormone exportieren, allerdings in sehr unterschiedlichen Konzentrationen und über mindestens zwei bis drei verschiedene Transportwege. Während z.B. IAA und iP/iPA in gut messbaren Konzentrationen erhalten wurden fanden sich GAs und Z/ZR-Cytokinine nur im unteren Pikogramm (billiardstel- Gramm) Bereich wieder. Hier zeigten sich auch deutliche von der Behandlung abhängige Unterschiede. Niedrige Temperaturen erhöhten deutlich den Blatt-Export von iP/iPA Cytokinin, während KClO₃ Behandlung entweder keinen oder gar einen hemmenden Effekt hatten. Daraus kann man schließen, dass dieser Hormonexport für die BI nicht essentiell ist. Es zeigte sich sogar, dass diese Cytokinine im subapikalen Gewebe und z.T. sogar in der Knospe nur in Abwesenheit von Blättern akkumulieren, also unter Bedingungen, die nicht zur BI führen. Ganz anders verhält es sich mit Z/ZR Cytokinin, die nur unter Bedingungen akkumulierten die auch BI ermöglichen, also Gegenwart von ausgewachsenen Blättern und KClO₃ Behandlung. Diese Ergebnisse und weitere Versuche über den Einfluss des Blattalters, die in einer parallelen Dissertation gewonnen wurden, führten zu interessanten Schlussfolgerungen über mögliche Regulationsmechanismen der Anreicherung der beiden Klassen von Cytokinin und deren Einfluss auf die BI. Die Resultate der beiden parallelen Dissertationen lassen vermuten, dass die Akkumulation von Z/ZR ein essentieller Faktor der BI bei Longan und wahrscheinlich auch bei anderen Fruchtbäumen darstellt. Die Ergebnisse liefern auch Hinweise wie man diese Hypothese überprüfen und damit u.U. auch andere Methoden der "off season" BI finden könnte.