

**Participation of Correlative Hormonal Signals in the
Floral Induction of Longan (*Dimocarpus longan* Lour.) Trees
Induced by the Application of Potassium Chlorate**

Kanokwan Sringarm

Hohenheim 2008

Summary

The longan (*Dimocarpus longan* Lour.) tree, a member of subtropical fruit trees, absolutely requires low temperature (LT) for floral induction (FI), which restricts fruit production and marketing to a few weeks in the year. Due to the accidental discovery of a Thai farmer that potassium chlorate (KClO_3), a former herbicide and ingredient of firework, can induce "off season" FI and as a result fruit production all year round, marketing of longan production is now greatly extended. In addition this opportunity allows researchers a far more intensive investigation into the regulation of FI of perennial fruit trees making longan a kind of model tree in a widely neglected area of plant FI research.

In this study the hormonal changes that occur during FI induced by LT-treatment were investigated and results compared with those obtained after KClO_3 treatment. Because hormones are often used by the plant as long distance signals hormone transport, particularly between leaves and shoot buds, was analyzed beside extractable hormones in this and in a Potchanasin (parallel thesis) investigation. The results show that the concentrations of the auxin IAA and of gibberellins, two hormones suspected to inhibit FI, were increased by both treatments initially, but later, during the time of FI, declined to low levels in the shoot apical bud (SAB). More interesting was the finding of a close relationship between the concentrations of endogenous cytokinins (CKs) in the SAB and FI. Low temperature e.g. considerably stimulated the leaf export of IAA and particularly of the iP/iPA- type CKs. Contrary to this KClO_3 , which stimulated FI as much as LT, rather inhibited the export of these two hormones. Because in the parallel and in subsequent experiments (see below) it was shown that a strong increase in CKs seem necessary for FI to occur this early difference between LT and KClO_3 on hormone transport may indicate that both treatments induce FI by different methods. The source for the strong increase in SAB-CKs after KClO_3 treatment observed in the parallel study can, therefore, not be the leaves. Other possibilities including roots and inactive CK-conjugates stored in bark or wood, which are possibly hydrolyzed under the influence of KClO_3 , are

discussed as alternative sources. Preliminary investigations are under way to prove this hypothesis.

Under natural conditions mature leaves beside LT are essential for FI and their presence can not be replaced by $KClO_3$. Experiments by shading the trees were therefore performed to investigate whether this "leaf effect" on $KClO_3$ induced FI was mediated by plant hormones. This experiment revealed that shade not only prevented $KClO_3$ induced FI but extremely reduced CK-accumulation in the SAB observed after $KClO_3$ treatment without shade. This effect on FI could be traced back to the reduction in light intensity rather than to a shift in the spectral distribution of the light. A closer examination of the $KClO_3$ induced CK-accumulation in SAB and its prevention by shade and a defoliation experiments in a parallel investigation led us to the hypothesis that leaves in conjunction with $KClO_3$ may provide a substance or an enzyme which facilitates the last step in the biosynthesis of Z/ZR from its precursor iP/iPA. Because Z/ZR-type CKs are obviously needed for FI prevention of their biosynthesis by shade or defoliation may be the cause for the observed absence of FI by these two treatments.

As in the first experiment changes in the concentrations of gibberellins and IAA did not show remarkable associations to shade provoked inhibition of FI. However, in this experiment a very significant increase of IAA export of $KClO_3$ treated SAB was observed which was entirely prevented by shade. Whether this increase in IAA export is an accidental coincidence or causally related to $KClO_3$ induced FI needs more investigation and is discussed in more detail in the thesis.

Floral induction in subtropical fruit trees requires not just leaves but mature leaves. Literature shows that immature leaves either inhibit or delay FI. This "immature leaf effect" and its influence on hormonal changes and on FI were investigated in a third experiment. The results demonstrate that immature leaves did not prevent but considerably delayed FI and, more important, produced "mixed or leafy inflorescences" consisting of flowers plus leaves. This known phenomenon is usually taken as evidence that immature leaves produce a "floral inhibitory" substance. However, our results demonstrate that

KClO₃ minus immature leaves greatly stimulated iP/iPA- type and even more so Z/ZR- type CK accumulation in the SAB as well as in the subapical tissue. The presence of immature leaves, however, almost totally prevented this iP/iPA increase in SABs and delayed Z/ZR increase. This parallel delay in FI and Z/ZR increase in SAB again demonstrates that this type of CKs are intimately involved in the KClO₃ induced FI of longan.

Together with the executed parallel experiments it could be shown that CKs and in particular Z/ZR cytokinins show a sometimes dramatic increase in SABs by all treatments that stimulated FI in longan and simultaneously decreased CKs by treatments which delayed or prevented FI. Although this is evidence that these CKs are strong "floral promoters" in longan it is in no way proof that this relationship is a causal one. Further experiments need to dissect both processes showing that FI only occurs after a strong increase in Z/ZR respectively that FI can occur in the absence of this increase.

Zusammenfassung

Der Longanbaum (*Dimocarpus longan* Lour.) gehört zu einer Gruppe subtropischer Bäume, die zu ihrer Blüteninduktion (BI) niedrige Temperaturen (12 bis ca. 18°C) benötigen. Dies beschränkt ihre Fruchtproduktion auf einen kurzen Zeitraum während des Jahres, obwohl diese von den übrigen Klimabedingungen her gesehen nahezu während des ganzen Jahres möglich wäre. Die zufällige Beobachtung eines Thailändischen Farmers, dass die Applikation von Kaliumchlorit BI auch bei wesentlich höheren Temperaturen ermöglichen kann, erregte daher großes Interesse unter den Farmern und ermöglicht z.Z. die nahezu ganzjährige Produktion dieser Früchte. Darüber hinaus verschafft diese Methode aber auch den Wissenschaftlern Möglichkeiten die physiologischen und molekularbiologischen Regulationsmechanismen der BI bei Fruchtbäumen wesentlich intensiver zu untersuchen, womit Longan zu einem Art "Modellbaum" für die Analyse der Regulation der BI werden könnte .

In zwei parallelen Dissertationen wurde versucht, die hormonelle Seite dieser BI näher zu analysieren. 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 Hormone von der Pflanze häufig als "long distance" Signale verwendet werden, wurde auf diese Gruppe von Regulationsfaktoren und ihren Einfluss auf die BI bei dieser Dissertation besonderes Augenmerk gerichtet. Vor allem die Rolle der Blätter und ihre Hormonkonzentrationen und ihr Hormonexport wurden in Abhängigkeit von den beiden Möglichkeiten zur Induktion der BI (niedrige Temperatur und KClO_3 Behandlung) untersucht. Die Untersuchungen wurden dabei auf die wahrscheinlich am meisten relevanten Hormone Indollessigsäure (IAA), Gibberelline (GAs) und Cytokinine (Z/ZR und iP/iPA) beschränkt. Die Ergebnisse zeigten, dass GAs und Z/ZR Cytokinine nur in sehr niedrigen Konzentrationen (billiardstel Gramm) exportiert werden und keine Beziehung zu den Behandlungen erkennen ließen, so dass auf ihre weitere Analyse verzichtet wurde. Auxin

(IAA) und das Cytokinin iP/iPA wurden dagegen in deutlich größeren Konzentrationen **exportiert**, zeigten deutliche Unterschiede als Reaktion auf die Behandlungen und häufig **keine** Beziehung zu ihrer Konzentration in den Blättern, so dass man ihren Export als **Signalsubstanz** ansehen kann. Der Export dieser beiden Hormone zeigte auch den ersten **deutlichen** Unterschied zwischen einer durch niedrige Temperatur bzw. durch KClO_3 – Behandlung induzierten BI. Während niedrige Temperatur den Export von IAA wie von iP/iPA deutlich förderte hatte KClO_3 entweder keinen oder gar einen hemmenden Einfluss auf die beiden Exportraten. Da beide Behandlungen aber die BI zu etwa gleichen Raten förderten musste man zunächst annehmen, dass beide Hormonexporte keinen Einfluss auf die BI haben.

Da jedoch **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, wurden die Versuche in den Freilandversuchen intensiv weiter geführt. Diese Versuche ergaben einige erwartete und einige unerwartete Ergebnisse. Zunächst zeigte sich, dass trotz der meist hemmenden Wirkung von KClO_3 auf den iP/iPA Blattexport sich dieses Hormon als Reaktion auf eine KClO_3 Behandlung in der Sprossspitze anreicherte. Es muss also einen anderen source für diese Anreicherung als das Blatt geben. Entblätterungsversuche ergaben dann, dass diese Sprossanreicherung überhaupt nur dann stattfand wenn die Sprossspitze keine funktionelle Verbindung (Sprossringelung zwischen Blättern und Sprossspitze) zu ausgewachsenen Blättern hatte. In völligem Gegensatz dazu stand die starke oft extreme Anreicherung von Z/ZR vor allem in der Sprossspitze, die nun nur in Gegenwart von ausgewachsenen Blättern erfolgte, obwohl diese nur Spuren dieses Hormons exportierten (s.oben). Weitere Versuche durch starke Beschattung von Bäumen ergaben, dass dadurch nicht nur die durch KClO_3 induzierte BI sondern auch die starke Anreicherung von Z/ZR völlig unterbunden wurde. Wurden in diese Versuche nicht ausgewachsene sondern junge, “unreife” Blätter einbezogen, so zeigte sich, dass von diesen ein Hemmeffekt auf die BI wie die Spross- Akkumulation von Z/ZR, nicht jedoch von iP/iPA, ausgeht. Aus der Summe dieser und der in der parallelen Dissertation gezeigten Ergebnisse muss man schließen, dass eine Akkumulation von Z/ZR Cytokinin für eine BI essentiell ist, da keine BI ohne eine solche Akkumulation beobachtet werden

konnte. Die Möglichkeit, dass diese **Akkumulation** eine Folge und nicht eine Ursache einer BI ist bleibt bestehen, doch **spricht der zeitliche Anstieg der Cytokinine** dagegen. Die Rolle der Blätter, die hier sehr intensiv **untersucht wurde**, besteht definitiv nicht in der Bereitstellung von einem Cytokinin oder seiner **Vorstufe** spielt aber mit großer Wahrscheinlichkeit eine entscheidende Rolle im **Biosyntheseweg dieser Hormone**. Hier dürfte auch die **gemeinsame Reaktion von niedriger Temperatur und $KClO_3$** bei der BI zu suchen sein.

Die Ergebnisse dieser Dissertation haben nicht nur zu einer **erheblichen Erweiterung des Wissens** über die BI von Longan und wahrscheinlich auch anderer **Fruchtbäume** geführt, sondern zeigen auch Wege einer Untersuchung dieses immer noch **weitgehend unverständenen Vorganges** auf.