

Ruolo dell'auxina e della sensibilità delle piante alla luce nella dominanza apicale e proliferazione di 'Colt'

Calogero Iacona^{1*}, Marco Cirilli², Romano Roncasaglia³, Giuliano Dradi⁴, Fabiano Gattabria², Maurizio Zecchini², Rosario Muleo²

¹ Università di Pisa

² Università degli studi della Toscana

³ Vivai Piante Battistini Soc. Agr. s.s., Cesena

Apical dominance and proliferation of cherry rootstock 'Colt': the role of the interaction between auxin and diverse sensitivity of plant to the light

Abstract. Shoot branching is influenced by many factors and among them the apical dominance is one of the main processes. The shoot tip through apical dominance exerts a control on the outgrowth of axillary buds, and the suppression of growth also occurs by the correlative inhibition exerted by other growing buds or shoots. The level and/or flow of the plant hormone auxin in stems and buds is thought to be involved in these processes. Auxin inhibitors usually break the basipetally polar transport of endogenous auxin, the indole-3-acetic acid (IAA), which usually occurs via phloem and/or via active transport across the cells. Plants are sessile organisms that are rich in a plethora of biological sensors with which they perceive changes in the surrounding environment. For plants, light is the essential energy source and, as well as, an important environmental factor that regulates and controls the development and social coexistence of plants in a heterogeneous and/or homogeneous community. Plant chromoproteins translate the physical light signal into biochemical signals, which in turn regulate gene expression and physiological and phenological events. Phytochrome members are one of the chromoprotein families and they are active and respond to the relative amounts of red (610-690) and far-red (700-800) photons of the incident radiation, generating, for each phytochrome, a gradient of concentrations between the active form P_{fr} and the inactive form P_r . Phytochromes can control apical dominance and correlative inhibition through the syndrome of shade avoidance response. Results indicate that transgenic lines show a physiological background different between themselves and with *Colt-wt* line. Lateral buds development was inhibited by IBA especially in *Colt-wt*. The inhibition was

reduced in the plantlets of transgenic lines. The addition of the IAA-inhibitors into the medium promoted an almost complete transformation of lateral buds into shoot. The increase of branching percentage cannot be attributed, however, to the increased growth of fresh weight of cluster, since the increase of fresh weight of *Colt-PO1*, *Colt-PO2* and *Colt-PA* plantlets was less in the presence of inhibitors. In in vitro plantlets of *Prunus* and apple, phytochrome levels induced greater branching and higher number of buds developed in new shoots. This work confirms a positive action of phytochrome on lateral branching even in cherry rootstock, playing a role in the regulation of apical dominance.

Key words: auxin-transport inhibitors, phytochrome A, plant vigor, *Prunus*, shoot proliferation.

Introduzione

La correlazione inibitiva esercitata dal meristema apicale di un germoglio sulle gemme laterali sottostanti è in parte spiegata con l'azione esercitata dall'auxina endogena prodotta che quando viene trasportata, sia per via floematica sia tramite il trasporto attivo attraverso le cellule, ne blocca la crescita nei meristemi laterali (Cline 1994; Petrásek & Friml 2009). Gli inibitori dell'auxina endogena, l'acido indol-3-acetico (IAA), interrompono il flusso basipeto e l'accumulo di IAA nelle cellule dei meristemi laterali, come avviene con l'inibitore auxinico acido 2,3,5-triiodo benzoico (TIBA) e l'acido 1-N-naftalemico (NPA), o competono per il sito di riconoscimento, come ad esempio l'acido 2-(p-clorofenossi) isobutirrico (PCIB), di molte proteine AUX/IAA (Tiwari *et al.* 2001) o del sito di riconoscimento di proteine ARF (Li *et al.* 2016), le quali trasferiscono il segnale auxinico nel nucleo, attivando e/o reprimendo l'espressione di geni. Le variazioni del contenuto di IAA nei meristemi laterali regolano l'attivazione della divisio-

* calogero.iacona@unipi.it

ne cellulare e crescita delle gemme in germogli laterali (Zažímalová *et al.* 2010).

La luce nei suoi aspetti fisici (intensità, durata, qualità, direzione), è fondamentale per lo sviluppo e la crescita delle piante, le quali traducono l'energia del sole in energia chimica (glucosio). Le piante sono ricche di una pletera di sensori biologici con cui percepiscono l'ambiente circostante ed i suoi cambiamenti. La luce è anche un fattore di segnalazione ambientale che regola e controlla lo sviluppo e la convivenza sociale delle piante sia nelle comunità eterogenee sia in quelle omogenee (Cirvilleri *et al.* 2008; Muleo *et al.* 2003; Muleo & Iacona 2007). L'interazione competitiva tra piante determina il successo di un individuo e/o di una specie e si manifesta con sindromi tra le quali la *sindrome di fuga dall'ombra*, che controlla la dominanza apicale e l'inibizione correlativa (Franklin & Whitelam. 2005). Le cromoproteine delle piante traducono il segnale fisico della luce in segnale biochimico e regolano l'espressione genica e gli eventi fisiologici e fenologici della risposta. I fitocromi sono cromoproteine sensibili alle quantità relative di fotoni rossi (610-690) e rossi lontani (700-800) della radiazione incidente, e generano un segnale regolante lo sviluppo delle piante, anche di quelle coltivate in vitro (Morini & Muleo 2003).

L'obiettivo di questo lavoro è stato quello di comprendere come l'inibizione della auxina IAA interagisse con stati fisiologici differenti per la sensibilità alla luce in piante quasi isogeniche del portinnesto Colt (*P. avium* x *P. cerasus*). La differente sensibilità era stata indotta da un arricchimento del fitocromo A (*phyA*) di riso, inserito nel genoma di Colt. Al fine di valutare il comportamento delle piante sono state osservate la dominanza apicale e lo sviluppo e la crescita dei rami laterali, in condizioni di coltura *in vitro*.

Materiali e metodi

Il materiale vegetale ed i mezzi di coltura: le piantine delle linee Colt

Le linee transgeniche del portinnesto di ciliegio Colt sono state ottenute come riportato in Muleo *et al.* (2003) e Cirvilleri *et al.* (2008). Le linee transgeniche sono state coltivate *in vitro* su mezzo DKW (Driver & Kuniyuki, 1984), addizionato di 20 g L⁻¹ di saccarosio; sono stati inoltre aggiunti i seguenti fitoregolatori: BAP (1,5 mg L⁻¹), IBA (0,1 mg L⁻¹), GA₃ (0,1 mg L⁻¹). Il pH è stato titolato a 5,8 e prima del ciclo di sterilizzazione in autoclave, a 120°C per 20 minuti, la gelificazione del mezzo è stata attuata aggiungendo 7 g L⁻¹ di Bacto-Agar (Difco). La temperatura della camera di crescita è stata mantenuta a 24 ±1°C, con

fotoperiodo di 16/8. La fonte luminosa bianca è stata ottenuta con lampade fluorescenti Philips TDL 18W/35 con una irradianza di 40 μM m⁻² s⁻¹. Lo stesso mezzo DKW è stato impiegato nelle prove, senza l'aggiunta di 0,1 mg L⁻¹ di IBA, tranne che nel trattamento impiegato come controllo. Sono state impiegate piantine, quasi isogeniche, delle seguenti linee Colt-PA7, Colt-PO1, Colt-PO2, Colt-PA con diversa sensibilità alla luce, dovuta all'arricchimento del gene *phyA*, con quello di riso, e la linea del Colt-w.t. Cinque piantine di ciascuna linea sono state poste su 50 ml di mezzo in contenitori di vetro di 250 mL.

Impiego di inibitori auxinici, trattamenti

Gli inibitori sono stati sciolti in poche gocce di etanolo assoluto e portati a volume con acqua tiepida. Le piantine sono state sottoposte a quattro trattamenti per ciascun inibitore: per il TIBA i trattamenti sono stati 0,01, 0,1, 1, e 2 mg L⁻¹, mentre per i trattamenti con PCIB e NPA le quantità impiegate sono state 0,01, 0,1, 0,5 e 1 mg L⁻¹. Infine, sono stati effettuati due ulteriori trattamenti che sono stati impiegati come controllo: il primo senza IBA esogena e senza inibitori ed il secondo con l'aggiunta di IBA 0,1 mg L⁻¹, senza inibitori.

Per ciascun trattamento farmacologico sono stati impiegati 5 contenitori, ciascuno contenente 5 germogli ciascuno, per un totale di 25 piantine per trattamento. Le prove sono state ripetute tre volte ed hanno avuto una durata di 21 giorni. I parametri rilevati sono stati: peso fresco e peso secco totale del cluster, accrescimento del germoglio principale, numero di nodi neoformati ed il numero di gemme schiuse, allungamento dei germogli laterali, distanza apicale.

Analisi statistica

I dati sono stati sottoposti ad analisi della varianza e poiché non sono state rilevate differenze statistiche per ciascun trattamento per ciascuna linea tra le tre ripetizioni, le piantine delle tre ripetizioni sono state analizzate insieme. La separazione delle medie è stata effettuata con il test Tukey, per P = 0,05.

Risultati

Gli inibitori auxinici alle due quantità maggiori bloccano lo sviluppo delle piantine delle linee *Colt-PO1*, *Colt-PO2* e *Colt-PA*, pertanto non è stato possibile rilevare delle differenze nello sviluppo dei caratteri delle piantine tra l'inizio del trattamento e la fine dello stesso.

L'antagonista auxinico NPA, che compete per il sito di riconoscimento della proteina trasportatore

PIN, indipendentemente dalla sensibilità alla luce delle linee *Colt*, ha bloccato in egual misura la formazione di nuovi nodi. Nelle piantine della linea *Colt-PA7*, alle due più basse quantità dell'inibitore, è stata osservata la formazione significativa di numero maggiore di nodi. Le piantine delle linee vigorose, *Colt-wt* e *Colt-PA7* sono insensibili alle basse quantità di PCIB, manifestando uno sviluppo di nuovi nodi.

L'allungamento del germoglio è stato inibito da IBA nelle piantine del *Colt-wt*, ma non in quelle delle linee arricchite con *phyA*. I due inibitori del trasporto, TIBA e NPA hanno bloccato la crescita del germoglio, tranne che nella linea vigorosa *Colt-PA7*, che, con la linea *Colt-wt*, è risultata insensibile alle basse quantità di PCIB.

Il tasso di sviluppo di fitomeri, determinato come numero di gemme laterali formate per centimetro di crescita del germoglio, è stato condizionato negativamente sia da TIBA e NPA sia dall'antagonista dell'auxina, PCIB. Solo a quantità elevate di PCIB, nelle linee *Colt-wt* e *Colt-PA7*, e a quantità basse nella linea *Colt-PA*, è stato osservato un incremento di sviluppo di fitomeri.

Sia gli inibitori TIBA e NPA sia l'antagonista PCIB hanno indotto il rapido sviluppo e crescita delle gemme laterali sottostanti l'apice del germoglio. Infatti, la distanza apicale, indicante il numero di gemme laterali, all'ascella delle foglie espanse, che intercorrono tra le gemme laterali in attiva crescita e l'apice del germoglio, è stata ridotta o nulla indicando che l'auxina endogena è stata inibita nella sua azione. Questo comportamento è stato molto accentuato nelle linee *Colt-PO1*, *Colt-PO2* e *Colt-PA*.

Il tasso di proliferazione è stato significativamente maggiore nelle linee arricchite con *phyA*, alle due condizioni di controllo, ed è risultato accentuato nelle linee meno vigorose (tab. 1), indicando che le linee *phyA* hanno una diversa sensibilità alla luce e background fisiologico. A quantità inferiori di NPA e TIBA i genotipi modificati producono più germogli laterali del *Colt-wt*, mentre alle quantità maggiore non sono osservabili differenze. Un comportamento analogo è stato osservato con l'antagonista dell'auxina.

La presenza di IBA 0,1 riduce il peso fresco del cluster, significativamente nella linea *Colt-wt*, e nei genotipi arricchiti con fitocromo, eccetto che nella linea *Colt-PA7* (tab. 1). Il *Colt-wt* è meno sensibile, alle quantità più basse, al PCIB.

Discussione e conclusioni

I risultati indicano che i germogli delle linee transgeniche hanno un background fisiologico diverso da quelle della linea *Colt-wt*. Lo sviluppo delle gemme laterali in germogli è inibito dall'IBA presente nel mezzo, e l'inibizione è maggiore nel *Colt-wt*. L'inibizione è parzialmente soppressa allorché l'aggiunta nel mezzo di IBA è stata omessa. L'ampiezza di questa inibizione si è ridotta nei germogli delle linee transgeniche, ed in *Colt-PA*, *Colt-PO1* e *Colt-PO2* non è stata osservata differenza statistica tra quelli trattati con IBA rispetto a quelle non trattati. Poiché la schiusura delle gemme laterali, e la loro crescita in germogli, è regolata dall'IAA, l'aggiunta nel mezzo colturale degli inibitori ha determinato la trasformazione quasi completa delle gemme laterali in germogli sin dalle più basse quantità di inibitori impiegati. Lo sviluppo di una maggiore ramificazione non può esser attribuito a una maggiore crescita in massa fresca del cluster, poiché le linee *Colt-PO1*, *Colt-PO2* e *Colt-PA*, in presenza di inibitori sono cresciuti di meno. In piantine di *Prunus* (Muleo et al. 2001) e in piantine di melo (Muleo & Morini 2008), la quantità di fitocromo attivo è un prodromo per lo sviluppo di una maggiore ramificazione ed aumento del numero di gemme sviluppate in nuovi germogli. L'azione positiva del fitocromo sulla schiusura delle gemme laterali è stato già osservato in *Colt-wt* (Muleo e Iacona 2009), attribuendo al complesso dei fitocromi un ruolo di regolazione della dominanza apicale.

Riassunto

Due inibitori del trasporto e un competitore dell'auxina sono stati impiegati in linee transgeniche del portinnesto 'Colt', con diversa sensibilità alla luce indotta dal gene *fitocromo A* di riso, con l'obiettivo di valutare il ruolo dell'auxina e della vigoria della pianta. Il trattamento ha evidenziato una complessa interazione tra l'auxina endogena, da una parte, e la sensibilità delle linee alla luce, la quale è connessa con la vigoria della pianta. L'interazione evidenzia come la riduzione della vigoria sia associata ad una riduzione della dominanza apicale ed induca un incremento della ramificazione del cluster e della proliferazione.

Parole chiave: fitocromo A, inibitori trasporto auxinico, proliferazione, *Prunus*, vigoria.

Tab. 1 - Effetto degli inibitori dell'IAA sul tasso di ramificazione e crescita della massa delle piantine delle linee di Colt, aventi una diversa sensibilità alla luce.
 Tab. 1 - Role of IAA-inhibitors on branching rate and fresh weight growth of plantlets of the diverse Colt lines, shown different light sensitivity.

Inibitore	PCIB			NPA			TTIBA		
	Mezzo	Tasso di ramificazione	Peso fresco clu-ster (mg)	Mezzo	Tasso di ramificazione	Peso fresco clu-ster (mg)	Mezzo	Tasso di ramificazione	Peso fresco clu-ster (mg)
Linee Colt									
wild type	DKW + 0	64,3 ± 2,2	687,5 ± 15,9	DKW + 0	64,3 ± 2,2	687,5 ± 15,9	DKW + 0	64,3 ± 2,2	687,5 ± 15,9
wild type	DKW + IBA	51,1 ± 2,8	501,3 ± 11,6	DKW + IBA	51,1 ± 2,8	501,3 ± 11,6	DKW + IBA	51,1 ± 2,8	501,3 ± 11,6
wild type	DKW + 0,01	67,5 ± 2,4	566,9 ± 6,5	DKW + 0,01	70,5 ± 2,6	299,7 ± 10,6	DKW + 0,01	69,5 ± 3,2	515,8 ± 15,6
wild type	DKW + 0,1	81,1 ± 1,7	670,5 ± 6,4	DKW + 0,1	85,2 ± 2,6	476,0 ± 10,6	DKW + 0,1	78,2 ± 3,1	485,2 ± 8,8
wild type	DKW + 0,5	90,7 ± 2,7	445,7 ± 9,1	DKW + 0,5	100	295,2 ± 9,8	DKW + 1	96,2 ± 3,4	374,0 ± 9,8
wild type	DKW + 1	100	300,3 ± 9,7	DKW + 1	100	298,1 ± 8,6	DKW + 2	100	324,7 ± 6,1
PA7	DKW + 0	79,6 ± 2,8	769,4 ± 7,8	DKW + 0	79,6 ± 2,8	769,4 ± 7,8	DKW + 0	79,6 ± 2,8	769,4 ± 7,8
PA7	DKW + IBA	67,5 ± 3,0	731,5 ± 8,0	DKW + IBA	67,5 ± 3,0	731,5 ± 8,0	DKW + IBA	67,5 ± 3,0	731,5 ± 8,0
PA7	DKW + 0,01	77,3 ± 2,5	656,4 ± 9,5	DKW + 0,01	79,5 ± 1,6	525,0 ± 6,0	DKW + 0,01	76,1 ± 2,9	736,2 ± 6,6
PA7	DKW + 0,1	81,3 ± 2,3	557,6 ± 10,8	DKW + 0,1	82,1 ± 2,9	507,2 ± 11,7	DKW + 0,1	87,6 ± 2,8	770,8 ± 9,5
PA7	DKW + 0,5	100	406,9 ± 10,0	DKW + 0,5	100	393,1 ± 8,8	DKW + 1	100	340,2 ± 8,3
PA7	DKW + 1	100	349,5 ± 6,5	DKW + 1	100	351,1 ± 9,4	DKW + 2	100	302,4 ± 10,4
PO1	DKW + 0	85,9 ± 2,4	717,7 ± 14,5	DKW + 0	85,9 ± 2,4	717,6 ± 14,5	DKW + 0	85,9 ± 2,4	717,6 ± 14,5
PO1	DKW + IBA	80,2 ± 2,6	604,6 ± 13,3	DKW + IBA	80,2 ± 2,6	604,6 ± 13,3	DKW + IBA	80,2 ± 2,6	604,6 ± 13,3
PO1	DKW + 0,01	88,6 ± 3,2	561,1 ± 13,5	DKW + 0,01	84,8 ± 2,8	559,0 ± 7,4	DKW + 0,01	88,2 ± 2,4	557,0 ± 14,0
PO1	DKW + 0,1	98,1 ± 2,6	508,9 ± 11,2	DKW + 0,1	98,2 ± 2,4	397,2 ± 12,0	DKW + 0,1	100	434,1 ± 8,6
PO1	DKW + 0,5	n.d.	n.d.	DKW + 0,5	n.d.	n.d.	DKW + 1	n.d.	n.d.
PO1	DKW + 1	n.d.	n.d.	DKW + 1	n.d.	n.d.	DKW + 2	n.d.	n.d.
PO2	DKW + 0	87,2 ± 2,4	789,8 ± 17,7	DKW + 0	87,2 ± 2,4	789,8 ± 17,7	DKW + 0	87,2 ± 2,4	789,8 ± 17,7
PO2	DKW + IBA	81,1 ± 2,3	577,8 ± 15,8	DKW + IBA	81,2 ± 2,3	577,8 ± 15,8	DKW + IBA	81,2 ± 2,3	577,8 ± 15,8
PO2	DKW + 0,01	84,4 ± 2,9	568,9 ± 15,2	DKW + 0,01	95,5 ± 3,3	513,9 ± 15,9	DKW + 0,01	87,8 ± 3,7	479,2 ± 11,5
PO2	DKW + 0,1	99,1 ± 1,8	478,8 ± 15,4	DKW + 0,1	99,1 ± 1,8	334,0 ± 8,5	DKW + 0,1	100	420,3 ± 10,7
PO2	DKW + 0,5	n.d.	n.d.	DKW + 0,5	n.d.	n.d.	DKW + 1	n.d.	n.d.
PO2	DKW + 1	n.d.	n.d.	DKW + 1	n.d.	n.d.	DKW + 2	n.d.	n.d.
PA	DKW + 0	82,9 ± 2,6	688,0 ± 15,0	DKW + 0	82,9 ± 2,6	687,9 ± 15,0	DKW + 0	82,9 ± 2,6	687,9 ± 15,0
PA	DKW + IBA	79,2 ± 2,0	589,0 ± 9,0	DKW + IBA	79,2 ± 2,0	589,0 ± 9,0	DKW + IBA	79,2 ± 2,0	589,0 ± 9,0
PA	DKW + 0,01	85,3 ± 3,0	566,5 ± 14,3	DKW + 0,01	88,9 ± 3,3	542,5 ± 13,3	DKW + 0,01	88,2 ± 3,4	555,7 ± 16,6
PA	DKW + 0,1	100	442,1 ± 8,5	DKW + 0,1	100	330,8 ± 7,6	DKW + 0,1	96,4 ± 3,1	376,5 ± 9,7
PA	DKW + 0,5	n.d.	n.d.	DKW + 0,5	n.d.	n.d.	DKW + 1	n.d.	n.d.
PA	DKW + 1	n.d.	n.d.	DKW + 1	n.d.	n.d.	DKW + 2	n.d.	n.d.

Bibliografia

- CIRVILLERI G., SPINA S., IACONA C., CATARA A., MULEO R., 2008. *Study of rhizosphere and phyllosphere bacterial community and resistance to bacterial canker in genetically engineered phytochrome A cherry plants*. J. Plant Physiol., 165: 1107-1119.
- CLINE M.G., 1994. *The role of hormones in apical dominance. New approaches to an old problem in plant development*. Physiol. Plant., 90: 230-237.
- DRIVER & KUNYUKI, 1984. *In vitro propagation of paradox walnut rootstock*. HortScience, 19(4): 507-509.
- FRANKLIN K.A., WHITELAM G.C., 2005. *Phytochromes and shade-avoidance responses in plants*. Annals Bot. 96: 169-175.
- IACONA C., MULEO R., 2009. *L'azione della qualità della luce nei diversi stadi della propagazione in vitro e post vitro del portinnesto Colt*. ITALUS HORTUS, 16: 271-273.
- LI S.-B., XIE Z.-Z., HU C.-G., ZHANG J.-Z., 2016. *A review of auxin response factors (ARFs) in plants*. Front. Plant Sci., 7: 47.
- MORINI S., MULEO R., 2003. *Effects of light quality on micropropagation of woody species*. In: S. Mohan Jain and Katsuaki Ishii ed., Micropropagation of woody trees and fruits. Kluwer Academic Publisher (Dordrecht, Boston, London): 3-35.
- MULEO R., MORINI S., CASANO S., 2001. *Photoregulation of growth and branching of in vitro cultured plum shoot (P. cerasifera Mr.S 2/5): physiological evidence for two photosystems activity*. In Vitro Cell Dev. Biol.-Plant, 37: 609-617.
- MULEO R., IACONA C., NICESE F., INTRIERI M.C., BOSCHERINI G., LORETI F., BULATTI B., THOMAS B., 2003. *Overexpressing PhyA changes the cherry plant sensibility to the proximity of light signal*. In: 7th Int. Conf. Plant. Mol. Biol, Barcellona, 23-28 June. Barcellona, 23-28 June, ISPMB
- MULEO R., IACONA C., 2007. *Light Perception and Timekeeping Systems in Plants: The Biological Value of the Domain of Time*. RIVISTA DI BIOLOGIA, 100: 16-21.
- MULEO R., MORINI S., 2008. *Physiological dissection of blue and red-light regulation of apical dominance and branching in M9 apple rootstock growing in vitro*. J. Plant Physiol., 165: 1838-1846.
- PETRÁSEK J., FRIML J., 2009. *Auxin transport routes in plant development*. Development, 136(16): 2675-88.
- TIWARI S.B., WANG X.J., HAGEN G., GUILFOYLE T.J., 2001. *AUX/IAA proteins are active repressors, and their stability and activity are modulated by auxin*. Plant Cell 13(2): 2809-2822.
- ZAŽÍMALOVÁ E., MURPHY A.S., YANG H., HOYEROVÁ K., AND HOŠEK P., 2010. *Auxin Transporters - Why So Many?* Cold Spring Harb Perspect Biol. 2:a001552.