

## ACCION DEL PHOSFON-D Y CCC EN *RUDBECKIA BICOLOR* NUTT.

Por R. F. PONT LEZICA \*\*, A. JACQMARD \* y R. DELTOUR \*

### SUMMARY

*Rudbeckia bicolor* a long-day plant was treated with the growth retardants Phosfon-D and CCC in order to inhibit flowering by blocking the gibberellin synthesis. Endogenous gibberellin activity was tested in growth-retardant-treated plants, none gibberellin-like activity was detected in those plants. Treatments of CCC and Phosfon at the same time, inhibit flowering completely.

### INTRODUCCION

Desde hace algunos años se sabe que el Phosfon-D (cloruro de 2,4 diclorobencil-tributilamonio), el CCC (cloruro de 2-cloroetil-tributilamonio), AMO-1618 (cloruro de 4-hidroxil-5 isopropil-2-metilfenil-trimetilamonio, carboxilato 1, piperidina) y otros compuestos químicos son capaces de detener el crecimiento del tallo de numerosas plantas (MARTH, PRESTON y MITCHELL, 1953; TOLBERT, 1960; WIRVILLE y MITCHELL, 1950). Algunos autores constatan que estos inhibidores de crecimiento inducen un comportamiento inverso al provocado por el ácido gibberélico (AG) (CATHEY, 1959; WITWERT y TOLBERT, 1960). Parecen existir interacciones entre gibberelinas y ciertos retardantes del crecimiento en el alargamiento del entrenudo de poroto (DOWNS y CATHEY, 1960), en el crecimiento de *Ulothrix* (CONRAD y SALTMAN, 1960), en la división celular de crisantemo (SACHS, LANG, BRETZ y ROACH, 1960), en la floración de *Samolus* (BALDEV y LANG, 1965) y de *Pharbitis* (ZEEVART, 1964).

Por otra parte se ha constatado que en el hongo *Gibberella fujikuroi*, en dos líneas que producen gibberelinas diferentes, la biosíntesis de las mismas es inhibida por retardantes (HARADA y LANG, 1965). Este efecto también ha sido observado en plantas superiores tales como *Pisum* (BALDEV, LANG y ACATEP, 1965) y *Avena* (SIMPSON, 1966).

\* Asistentes en el Instituto de Botánica de la Universidad de Lieja, Bélgica.

\*\* Jefe de Trabajos Prácticos en la Facultad de Ciencias Agrarias de la U.N.C., Mendoza, Argentina.

En un trabajo muy cuidadoso, DENNIS, UPPER y WEST (1965) demostraron que esos retardantes inhiben la formación de (-)-kaureno y (-)-kaureno-19-ol, precursores de las gibberellinas.

Con estas bases hemos querido estudiar la importancia de las gibberellinas en la floración de *Rudbeckia bicolor*, planta de día largo que puede ser inducida para florecer con fotoperíodos mayores de 12 horas, o con aplicaciones de AG cuando se la cultiva en fotoperíodos no inductores.

## MATERIAL Y METODOS

Las experiencias se realizaron con *Rudbeckia bicolor* NUTT. variedad Etoile de Kelvedon, planta de día largo estricta, cuyo fotoperíodo crítico es de 12 horas. Las plantas se cultivaron en el Fitotrón de Lieja a una temperatura constante de 20°C y 80 % de humedad relativa; la luz fue proveída por tubos fluorescentes Phytor con una intensidad de 5000-7000 lux. El tratamiento fotoperiódico fue de 8 ó 16 hs, según las experiencias realizadas.

*Tratamientos con Phosfon-D:* el compuesto se mezcló con la tierra de cultivo secada previamente en horno, en proporciones de 2, 4 y 6 % en peso. Este producto es tóxico en solución acuosa por lo que es necesario aplicarlo al suelo, siendo su acción permanente durante todo el cultivo, debido a su largo poder residual.

*Tratamientos con CCC:* el CCC se aplicó en solución acuosa a las concentraciones siguientes:  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  ó  $10^{-4}$  M junto con el riego. Cada planta recibió 10 ml de solución cada cinco días. El número de aplicaciones varía según las series experimentales.

*Tratamiento con AG:* se aplicó en solución acuosa depositando una gota entre las hojas más jóvenes. Cada planta recibió 1 ó 2 microgramos de AG.

Cuando dos o tres sustancias se aplican simultáneamente el tratamiento se realiza en la misma forma que se describe para cada sustancia por separado.

*Observaciones morfológicas:* los resultados descriptos en este trabajo son medias tomadas en la siguiente forma: altura de plantas: desde el nudo cotiledonar al brote terminal, medido una vez por semana.

Número de hojas: se toma a medida que aparecen, considerando que una hoja existe cuando alcanza 0,5 cm de longitud.

Los porcentajes de plantas florecidas se calculan cuando las brácteas de la inflorescencia han aparecido.

*Determinación de gibberellinas endógenas:* esta valoración se hizo sobre 40 plantas por tratamiento. Las hojas y el tallo se congelan y trituran, extrayendo con etanol 75 %, durante 48 hs, renovando

el alcohol a las 24 hs. El extracto alcohólico se evapora al vacío hasta el momento que todo el alcohol ha desaparecido. El residuo acuoso se acidifica a pH 2.5-3.0 y se agita con una mezcla de carbón/celite (1/1) durante dos horas, se elimina el residuo acuoso y se cluye el carbón con acetato de etilo. Este eluado se reduce a 1 ml por evaporación al vacío y se cromatografía en papel Wathman Nº 1, en un sistema de isopropanol/amonio/agua (10:1:1). El cromatograma se utiliza para el dosaje biológico de gibberellinas. Utilizamos el test de crecimiento de hipocotilo de lechuga (cv. Reine de Mai).

## RESULTADOS

Damos acá los resultados de las principales experiencias que nos permitieron precisar progresivamente la acción del Phosfon-D y CCC en el crecimiento del tallo y floración de *Rudbeckia*.

### I. ACCIÓN DEL PHOSFON-D O CCC EN PLANTAS CULTIVADAS EN DÍALARGO. TENTATIVA DE REVERSIÓN POR AG.

*Acción del Phosfon-D:* Las plantas se trataron con concentraciones de 2, 4 y 6 % a partir del 20º ó 30º día de cultivo.

Independientemente de la concentración y fecha de tratamiento, el Phosfon inhibe el crecimiento del tallo. La foto 1 muestra el efecto de diferentes concentraciones en plantas tratadas a partir del trigésimo día de cultivo. La inhibición aumenta con la concentración. El número de hojas no parece ser afectado (cuadro 1). En cuanto a la floración, no es inhibida por ninguno de los tratamientos, se nota solamente un ligero retardo en la aparición de las inflorescencias (cuadro 2). Las plantas tratadas con Phosfon el 30º día, recibieron a los 63 días de cultivo 1 µg de AG. La aplicación de esta pequenísimas cantidad de AG es suficiente para reducir el retardo en la aparición de las inflorescencias (cuadro 2).

*Acción del CCC:* Cada planta fue tratada con 10 ml de solución acuosa de CCC en concentraciones de  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$  M, los días 20, 25 y 30 de cultivo.

El CCC inhibe el crecimiento caulinar de *Rudbeckia*, siendo su acción directamente proporcional a la concentración usada (foto 2). La aparición de hojas se retarda un poco a las concentraciones de  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$  M, pero el número de hojas alcanzado en el momento de la floración no se altera (cuadro 3).

Tampoco el CCC impide la floración, pero la retarda, siendo este retraso más fuerte a mayores concentraciones (cuadro 4).

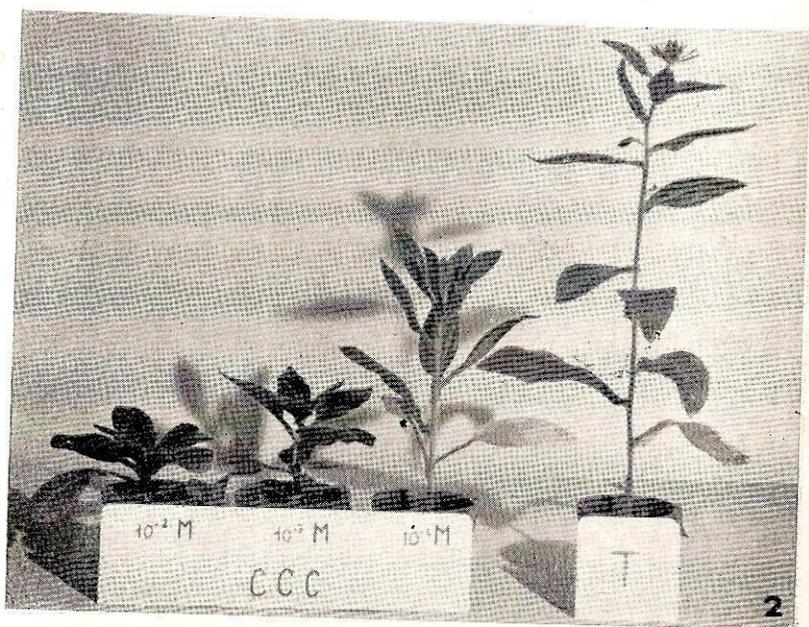
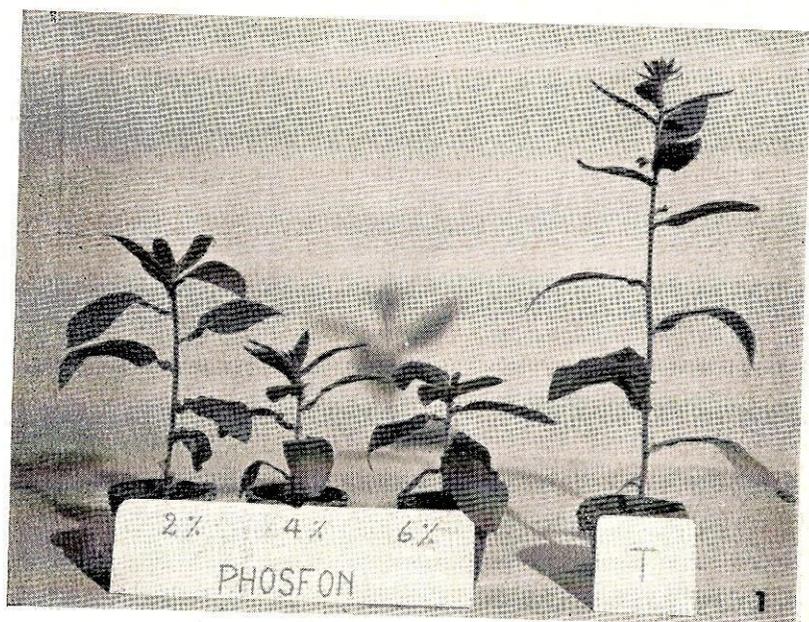


Foto 1. — Efecto de diferentes concentraciones de Phosfon-D sobre el alargamiento caular de *Rudbeckia*. — Foto 2. Efecto de dosis diferentes de CCC, suministradas por medio del riego, sobre el alargamiento caular de *Rudbeckia*.

CUADRO 1

Número medio de hojas formadas en las plantas testigo, tratadas con Phosfon-D desde los 30 días de cultivo, y en los tratamientos de Phosfon revertidos por el ácido gibberélico (AG)

Edad en días	21	31	42	52	58	63	68	73	79
Tratamientos									
Testigo.....	3,6	6,2	10,4	15,0	16,8	16,8	16,8	Flores	Flores
Phosfon 2 %.....	3,0	5,6	8,4	13,4	15,6	18,0	18,0	Flores	Flores
Phosfon 4 %.....	4,0	6,0	8,8	13,0	14,8	16,6	16,6	Flores	Flores
Phosfon 6 %.....	3,6	5,8	8,6	12,6	13,8	16,4	16,6	17,0	17,6
Acido Giberélico ....	3,6	6,4	10,6	16,0	16,4	16,4	Flores	Flores	Flores
Phosfon 2 % + AG...	3,0	5,6	9,2	13,6	14,4	17,6	18,0	18,4	Flores
Phosfon 4 % + AG...	4,0	5,8	9,4	13,4	16,2	17,0	Flores	Flores	Flores
Phosfon 6 % + A x...	3,6	6,4	9,4	13,6	15,0	16,8	Flores	Flores	Flores

CUADRO 2

Porcentaje de plantas florecidas de acuerdo a los distintos tratamientos

Edad	52	58	63	68	73	79
Tratamientos						
Testigo.....	40	40	80	100	100	100
Phosfon 2 %.....	0	0	80	100	100	100
Phosfon 4 %.....	20	20	60	100	100	100
Phosfon 6 %.....	0	0	0	40	80	100
Acido Gibberélico.	80	100	100	100	100	100
Phosfon 2 % + AG	0	0	20	60	100	100
Phosfon 4 % + AG	0	40	40	100	100	100
Phosfon 6 % + AG	20	40	40	100	100	100

La aplicación de 2  $\mu$ g de AG neutraliza la inhibición del crecimiento provocada por el CCC y disminuye el retardo provocado en la floración (cuadro 4).

## II. ACCIÓN DEL PHOSFON-D Y CCC EN PLANTAS CULTIVADAS EN DÍAS-CORTOS Y TRANSFERIDAS A DÍAS-LARGOS POR TIEMPOS LIMITADOS.

Puesto que se ha visto que la acción de los retardantes es bastante lenta, se pensó que podía comenzar su efecto una vez que se habían inducido las plantas fotoperiódicamente, y no podían en ese caso sino retardar la apertura de las inflorescencias. Es por eso que se eligió tratar plantas cultivadas en condiciones no inductivas durante diez días, luego colocarlas un cierto número de días en fotoperíodo inductivo, lo suficiente como para captar el estímulo floral, y luego volverlas a colocar en días cortos, donde se puede manifestar el fenómeno de floración si ha sido precedido de un período inductivo.

Plantas cultivadas en días cortos durante 26 días, reciben tratamientos de CCC solamente, o bien tratamientos conjuntos de CCC y Phosfon. La concentración de Phosfon utilizada es de 4 %, la de CCC  $10^{-2}$ M, que se aplica una vez por semana durante dos meses. Diez días luego de comenzar el tratamiento se colocaron lotes de plantas en días largos (16 hs) durante 20, 30 y 40 días, para inducir floración. Luego de ese período se las volvió a trasladar a días cortos.

Los tratamientos de 30 ó 40 días largos provocan un alargamiento del tallo (fig. 1). El tratamiento con CCC inhibe un poco este crecimiento; sin embargo, el tratamiento conjunto de CCC y Phosfon impide el alargamiento quedando las plantas en roseta.

CUADRO 3

Promedio de número de hojas formadas en cada uno de los tratamientos en relación con el tiempo de cultivo

Edad	21	31	42	52	58	63	68	73	79	9
Tratamientos										
Testigo.....	3,6	6,6	11,4	15,6	17,0	18,0	18,2	Flores	Flores	Flores
CCC 10 <sup>-2</sup> M.....	3,6	5,6	9,0	12,4	14,8	16,4	16,4	16,8	18,0	18,2
CCC 10 <sup>-3</sup> M.....	3,6	5,4	8,8	12,6	14,8	16,4	18,0	18,6	18,8	19,6
CCC 10 <sup>-4</sup> M.....	3,6	6,0	10,0	14,8	17,4	18,0	18,8	19,4	Flores	Flores
CCC 10 <sup>-2</sup> M + AG.	3,6	5,0	8,2	12,2	15,2	17,8	18,6	19,0	Flores	Flores
CCC 10 <sup>-3</sup> M + AG.	3,6	5,8	9,6	13,4	17,0	19,2	19,8	Flores	Flores	Flores
CCC 10 <sup>-4</sup> M + AG.	3,6	5,8	11,0	14,8	18,0	18,6	18,8	Flores	Flores	Flores

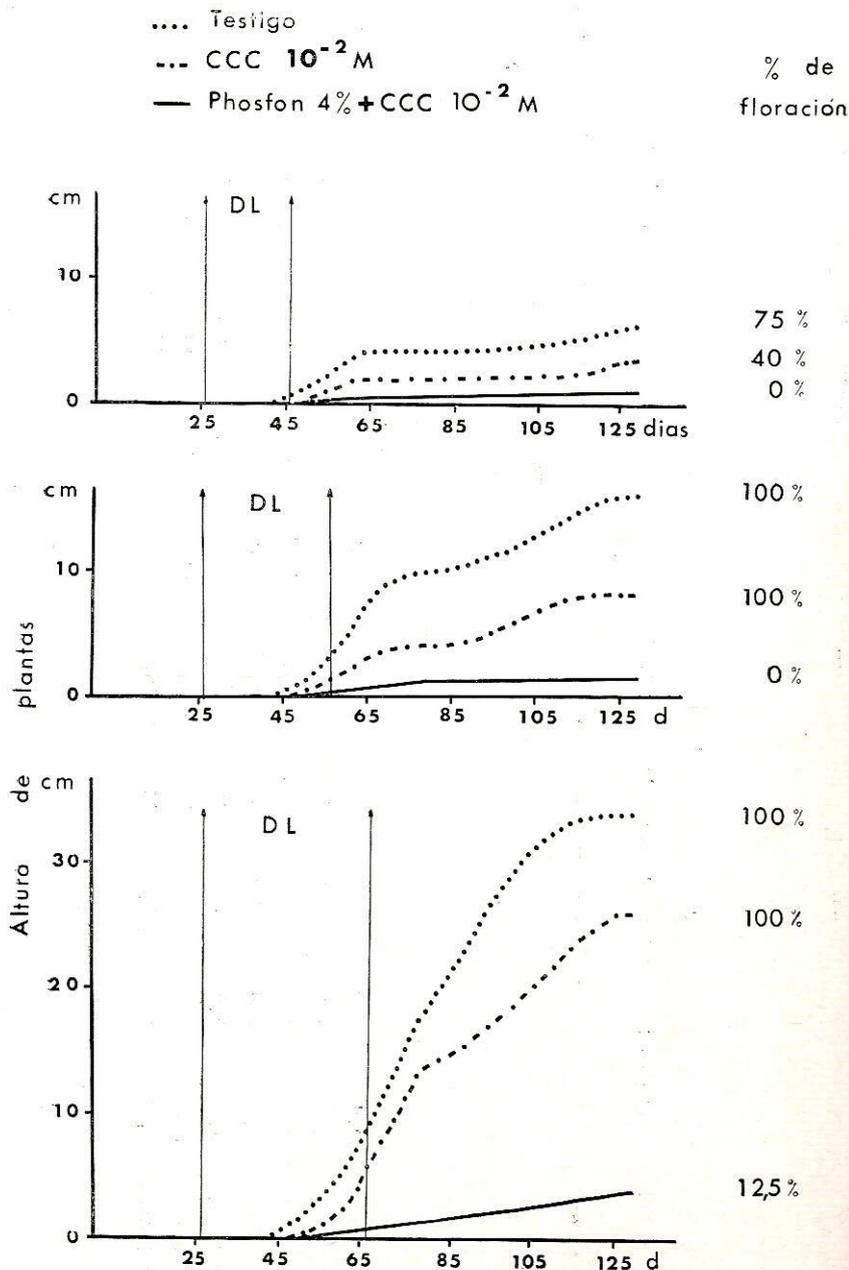


Fig. 1. — Comparación de alturas de plantas tratadas con Phosfon 4% + CCC  $10^{-2}$  M a la misma concentración y testigo, que han sufrido períodos inductores (DL) diferentes (20, 30 y 40 días). Se consignan también los porcentajes de floración en cada variante.

## CUADRO 4

Porcentaje de plantas florecidas de acuerdo a los distintos tratamientos de CCC y AG

Edad	52	58	63	68	73	90
Tratamientos						
Testigo . . . . .	40	40	80	100	100	100
CCC $10^{-2}$ M . . . . .	0	0	0	40	40	100
CCC $10^{-3}$ M . . . . .	0	0	0	40	80	100
CCC $10^{-4}$ M . . . . .	20	20	40	60	100	100
Acido Gibberélico . . . . .	80	100	100	100	100	100
CCC $10^{-2}$ M + AG . . . . .	0	0	40	40	100	100
CCC $10^{-3}$ M + AG . . . . .	20	20	60	100	100	100
CCC $10^{-4}$ M + AG . . . . .	0	60	80	100	100	100

La producción de hojas es más rápida en las plantas transferidas durante períodos más largos en días inductores. Aunque esta aceleración no es sino momentánea ya que todas las plantas alcanzan el mismo número de hojas en floración.

La floración se retarda y es parcialmente inhibida por la aplicación de CCC en el tratamiento de 20 días largos. Cuando se tratan las plantas con CCC y Phosfon simultáneamente, se impide la floración en un 100 % de los lotes de 20 y 30 DL, y en un 87,5 % al lote de 40 DL (fig. 1).

### III. ACCIÓN DE LOS RETARDANTES SOBRE EL NIVEL DE GIBBERELLINAS ENDÓGENAS DE *RUDBECKIA*.

Se ha querido constatar si el efecto de los retardantes como inhibidor de la síntesis de gibberellinas en el hongo y en algunas plantas superiores, se produce también en *Rudbeckia*.

Diferentes lotes de plantas se trataron con CCC ( $10^{-2}$  M) y con Phosfon-D (4 %) y se colocaron luego de 20 días en condiciones inductivas. Después de 30 días bajo fotoperíodos largos, se hicieron determinaciones de gibberellinas naturales.

Los resultados muestran que tanto el lote tratado con CCC como el tratado con Phosfon no presentan ninguna actividad del tipo gibberellinas, con respecto al testigo, por el contrario, se observa, una inhibición marcada.

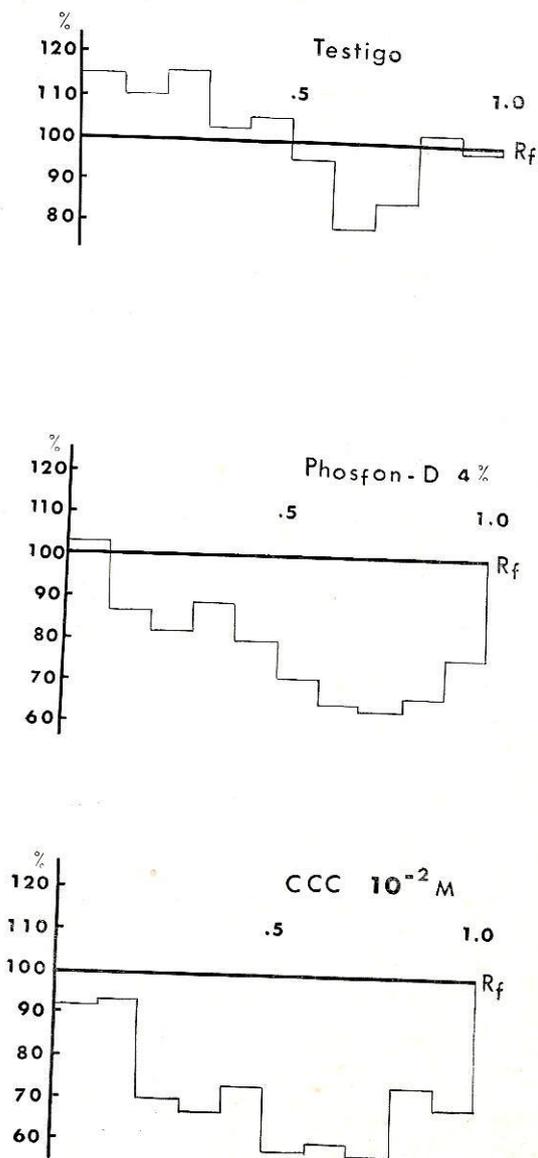


Fig. 2. — Histogramas que muestran la actividad biológica de sustancias tipo gibberellinas (testigo) y zonas inhibitorias en las plantas tratadas con retardantes.

## DISCUSION

Nuestros ensayos nos permiten deducir que tanto el Phosfon como el CCC ejercen una inhibición marcada sobre el alargamiento del tallo de *Rudbeckia*. Esta acción se opone al efecto estimulador del AG y puede ser anulada parcial o totalmente por un tratamiento adecuado con AG.

Sobre este punto, se confirman los resultados de varios autores con AMO en remolacha (MARGARA, 1961), en crisantemo (SACHS *et al.*, 1960); con AMO, CCC y Phosfon en crisantemo (SACHS y KOFRANEX, 1963); en *Perilla* (DELTOUR y JACQMARD, 1967).

Si las plantas tratadas con retardantes se mantienen permanentemente en DL inductores, no se inhibe la floración. Pero la aplicación de Phosfon y CCC simultáneamente a plantas que solamente recibieron 20 ó 30 DL (suficientes para hacer florecer los testigos), inhibe completamente la floración.

Por otra parte, se constata que la acción de los retardantes sobre el tenor de gibberelinas endógenas es parecido al efecto que produce sobre *Gibberella* (HARADA y LANG, 1965) y en algunas plantas superiores tales como la arveja (BALDEV *et al.*, 1965) y *Echinocystis* (DENNIS *et al.*, 1965): hacen desaparecer toda actividad gibberelínica.

Los efectos de los retardantes sobre la floración son variables ya que hay plantas que se inhiben tales como *Bryophyllum* por Phosfon (MARCELLE y SIRONVAL, 1964) y CCC (ZEEVART y LANG, 1963), *Samolus* por AMO-1618 y CCC (BALDEV y LANG, 1965). Otras plantas no muestran ninguna reacción como la remolacha (MARGARA, 1961) o simplemente un ligero retardo en la aparición de las flores como en el pepino (OTA, 1962) y en *Cannabis sativa* (DALL'OLIO, 1964).

En el caso de *Rudbeckia* se puede inhibir la floración, pero solamente cuando el CCC y el Phosfon actúan juntos, puede ser esta inhibición total.

## BIBLIOGRAFIA

- BALDEV, B. and LANG, A., 1965. Control of flower formation by growth retardants and gibberelín in *Samolus parviflorus*, a long-day plant. Amer. J. Bot., 52 (4) : 408-417.
- BALDEV, B.; LANG, A. and AGATEP, A. O., 1965. Gibberelín production in Pea seeds of developping in excised pods; effect of growth retardant AMO-1618. Science, 147 (3654) : 155-157.
- CATHEY, H. M., 1959. Initiation and flowering of *Rhododendron* following regulation by light and growth retardants. Amer. Soc. Hort. Science, 86 : 753-760.
- CONRAD, H. M. and SALTMAN, P., 1960. Interaction of gibberellic acid and allyl trimethylammonium chloride upon growth of *Ulothrix*. Plant Physiol., 36, 685-687.

- DALL'OLIO, G., 1964. Osservazioni orientative circa l'azione antagonista del cloruro di clorocolina e dell'acido gibberellico sulle sviluppo vegetativo e riproduttivo di *Cannabis sativa*. Gior. Bot. Ital., 71: 35-42.
- DENNIS, D. T.; UPPER, CH. D. and WEST, CH. A., 1965. An enzymic site of inhibition of gibberellin biosynthesis by AMO-1618 and other growth retardants. Plant Physiol., 40 (5) : 948-952.
- DOWNES, R. J. and CATHEY, H. M., 1960. Effect of light, gibberellin and a quaternary ammonium compound on the growth of darkgrown red kidney beans. Botan. Gaz., 1 21 (4) : 233-237.
- HARADA, H. and LANG, A., 1965. Effect of some (2-chloroethyl) trimethylammonium chloride analogs and other growth retardants on gibberellin biosynthesis in *Fusarium moniliforme*. Plant Physiol., 40 (1) : 176-183.
- MARCELLE, R. et SIRONVAL, C., 1964. Action du Phosfon-D et de la gibbérelline sur la croissance et la floraison de *Bryophyllum tubiflorum*. Ann. Physiol. Vég. Fr., 2 (4) : 409-418.
- MARGARA, J., 1961. Comparaison des effets du bromure d'allyl-triméthyl-ammonium et de l'acide gibbérellique sur le développement d'espèces du genre Beta. C. R. Acad. Sci., 253 : 1606-1608.
- MARTH, P. C.; PRESTON, W. H. and MITCHELL, J. W., 1953. Growth controlling effects of some quaternary ammonium compounds on various species of plants. Botan. Gaz., 115 : 200-204.
- OTA, T., 1962. Studies on BCB (bromocholine bromide). V. Effect of BCB on the growth and flowering of cucumber plant. Sci Ref. Fac. Agric. Ibaraki Univ., 9 : 37.
- SACHS, R. M.; LANG, A.; BRETZ, C. F. and ROACH, J., 1960. Shoot histogenesis: subapical meristematic activity in a caulescent plant and the action of Ga and Amo-1618. Amer. J. Bot., 47 (4) : 260-266.
- SACHS, R. M. and KOFRANEX, A. M., 1963. Comparative cytohistological studies on inhibition and promotion of stem growth in *Crysanthemum morifolium*. Amer. J. Bot., 50 (8) : 772-779.
- SIMPSON, G. M., 1966. The suppression by (2-chloroethyl) trimethyl ammonium chloride of synthesis of a gibberellin-like substance by embryos of *Avena fatua*. Can. J. Bot., 44 : 115-116.
- SUPNIEWSKA, J. H., 1963. Observations on the action of trimethyl chloro-ethyl-ammonium chloride on plants. II. Wheat, carrot and beet. Bull. Acad. Pol. Sci., II (3) : 155-159.
- TOLBERT, N. E., 1960. (2-chloroethyl) trimethyl-ammonium chloride and related compounds as plant growth substances. - II. Effect of growth on wheat. Plant Physiol., 35 : 380-385.
- WENVILLE, J. W. and MITCHELL, J. W., 1950. Six new plant growth-inhibiting compounds. Botan. Gaz., 111 : 491-504.
- WITWER, S. H. and TOLBERT, N. E., 1960. (2-chloroethyl) trimethyl-ammonium chloride and related compounds as plant growth substances. - I. V. Growth, flowering and fruiting responses as related to those induced by auxins and gibberellin. Plant. Physiol., 35 : 871-877.
- ZEEVART, J. A. D., 1964. Effects of the growth retardant CCC on floral initiation and growth in *Pharbitis nil*. Plant. Physiol., 39 (3) : 402-408.
- ZEEVART, J. A. D. and LANG, A., 1963. Suppression of floral induction in *Bryophyllum daigremontianum* by a growth retardant. Planta, 59: 509-517.