

## Inducción de fluorescencia en pino. Respuesta de *Pinus halepensis* Miller, *P. nigra* Arnold y *P. pinaster* Aiton a los herbicidas hexazinona y simazina

M. Villarroya, M. Ortega, M.C. Chueca, J.M. García-Baudín \*

Dpto. de Protección Vegetal. INIA. Carretera de La Coruña km 7,5. 28040 Madrid

baudin@inia.es

### RESUMEN

Las primeras fases del desarrollo de pinos pueden verse afectadas por la competencia de las malas hierbas, siendo la utilización de herbicidas fundamental para su control, aunque este tratamiento no debe afectar al pino. En este trabajo, se estudia el efecto de dos herbicidas simazina y hexazinona en tres especies de pino, *Pinus halepensis*, *P. nigra* y *P. pinaster*, mediante medidas de la fase rápida de la cinética de inducción de fluorescencia clorofílica. El estudio se lleva a cabo sobre las primeras hojas caulinares de pino, sometidos a tratamiento con dosis de 2 y 4 ppm de cada uno de los herbicidas durante 48 horas. El tratamiento y la posterior recuperación, se lleva a cabo en cultivo hidropónico en cámara climática. En los tratamientos con hexazinona, *P. nigra* ha resultado más tolerante que *P. pinaster* y *P. halepensis*. No se han encontrado diferencias entre especies en la respuesta a simazina. En las tres especies de pino se produce una mayor recuperación de la actividad fotosintética, lo que indica una mayor tolerancia del árbol, a hexazinona que a simazina.

**PALABRAS CLAVE:** Fluorescencia clorofílica  
Herbicidas  
Hexazinona  
Simazina  
*Pinus halepensis*  
*Pinus nigra*  
*Pinus pinaster*

### INTRODUCCIÓN

El empleo de herbicidas en el cultivo de especies arbóreas pretende resolver los problemas de competición herbácea que surgen, tanto en los viveros (Frochot, 1986a), como

---

\* Autor para correspondencia

Recibido: 27-2-01

Aceptado para su publicación: 16-5-01

en las reforestaciones (Frochot, 1986b; Frochot *et al.*, 1986) así como en las modernas implantaciones forestales en tierras de cultivo agrícola promovidas por la PAC (Reglamento 2328/91). Es precisamente en estas tierras de labor, donde el problema adquiere mayor relevancia, no sólo por la presencia de malas hierbas adaptadas a los cultivos precedentes, sino, además, por las características de algunos climas como el mediterráneo, que favorece más la competencia de la hierba con el árbol, reduciendo sus posibilidades de establecimiento (Montero *et al.*, 1997). Debido a los problemas de erosión en gran parte de estas superficies en nuestro país, la utilización de herbicidas está considerado como un método adecuado para la protección del cultivo forestal frente a malas hierbas.

Herbicidas del grupo de las triazinas son susceptibles de empleo por el buen control que ejercen sobre un amplio espectro de malas hierbas, por su adecuada persistencia (Sheets *et al.*, 1962) y por la tolerancia mostrada por muchas especies arbóreas, en especial de coníferas (Miller *et al.*, 1988), aunque su selectividad puede ser muy diferente entre especies (Wood *et al.*, 1992).

Las cinéticas de inducción de fluorescencia clorofílica en hojas, permiten hacer un seguimiento de la penetración, translocación y destoxificación de herbicidas inhibidores del Fotosistema II (PSII) (Cadahia *et al.*, 1982; Ducruet *et al.*, 1984; Ducruet *et al.*, 1993; Habash *et al.*, 1985; Ahrens, 1989; Norsworthy *et al.*, 1999) entre los que se encuentran las triazinas. Estos herbicidas desplazan al segundo aceptor de electrones del PSII,  $Q_B$ , de su lugar de unión e impiden la reoxidación de  $Q_A$  reducido, primer aceptor de electrones del PSII, bloqueando de esta forma el flujo de electrones fotosintético y liberando la energía mediante un incremento en la fluorescencia. Al comienzo de la iluminación de hojas adaptadas a la oscuridad, el nivel de fluorescencia depende casi totalmente del estado redox de  $Q_A$ . Cuando la planta es iluminada con luz continua,  $Q_A$  actúa como amortiguador fotoquímico y el nivel de fluorescencia es bajo ( $F_0$ ). Este se eleva bifásicamente primero a un nivel intermedio ( $F_1$ ) que es causado por la reducción de  $Q_A$  y posteriormente a un segundo nivel ( $F_p$ ) debido a la reducción del conjunto de las plastoquinonas. Puesto que los inhibidores del PSII bloquean la reoxidación de  $Q_A$ , su presencia incrementa los niveles de fluorescencia hasta un nivel máximo constante ( $F_M$ ) (Krause, Weis, 1991; Bolhàr-Nordenkamp, Öquist, 1993). La medida de la fluorescencia clorofílica, ha sido muy empleada en el estudio del efecto de este tipo de herbicidas en especies herbáceas (Ducruet, Gasquez, 1978; Ahrens *et al.*, 1981; Richard *et al.*, 1983; Ali *et al.*, 1986) y puede ser de gran utilidad también en especies arbóreas, aunque hasta el momento sólo se ha empleado en *Pinus taeda* L. (Johnson, Stelzer, 1991) y *Pinus pinea* L. (Villarroya *et al.*, 1997, 1999).

En este trabajo estudiamos, mediante la fase rápida de la cinética de inducción de fluorescencia clorofílica, el efecto de dos triazinas, hexazinona y simazina sobre tres especies de pino, *P. halepensis*, *P. pinaster* y *P. nigra*. En *P. halepensis* y en *P. pinaster* se ha observado en ocasiones, reducción de su supervivencia tanto en campo (Peñuelas *et al.*, 1995; Fernández-Cavada *et al.*, 1995; Ortega *et al.*, 1999) como en ensayos de invernadero (Ortega *et al.*, 2000) mientras que *P. nigra* tolera en campo dosis elevadas de estos mismos herbicidas (Miller *et al.*, 1988).

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se ha utilizado como material vegetal plántulas de *Pinus halepensis*, *P. pinaster* y *P. nigra*, sembradas en invernadero en bandejas Forest-Pot, sobre un soporte de vermiculita impregnado con solución nutritiva Hewitt (Bould, Hewitt, 1963), a temperaturas entre  $22 \pm 2$  °C de máxima y  $12 \pm 2$  °C de mínima, sin aporte adicional de luz.

En el momento en que aparecieron las primeras hojas verdaderas de las plántulas (seis semanas después de la siembra), éstas fueron transferidas a una cámara climática en tubos de ensayo de 2,3 cm de diámetro y 24,5 cm de altura forrados con material opaco que contenían 90 ml de solución nutritiva Hewitt. Una semana después, se realizaron los tratamientos herbicidas, sustituyendo la solución nutritiva por otra conteniendo 0; 2 y 4 ppm (mg/l de materia activa) de hexazinona o simazina durante 48 horas. Al final del tratamiento, día 0, se extrajeron las plántulas de la solución con herbicida, se lavaron las raíces y se mantuvieron creciendo en solución nutritiva libre de herbicidas, hasta el final del ensayo. Se realizaron 10 repeticiones por tratamiento con una plántula por tubo de ensayo en cada repetición. Los ensayos se repitieron dos veces en el tiempo y se llevaron a cabo en cámara con un fotoperiodo de 16 horas a  $24 \pm 2$  °C (luz) y 8 horas a  $17 \pm 2$  °C (oscuridad), con una humedad relativa entre 50 % (luz) y 70 % (oscuridad) y una intensidad luminosa de  $100 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

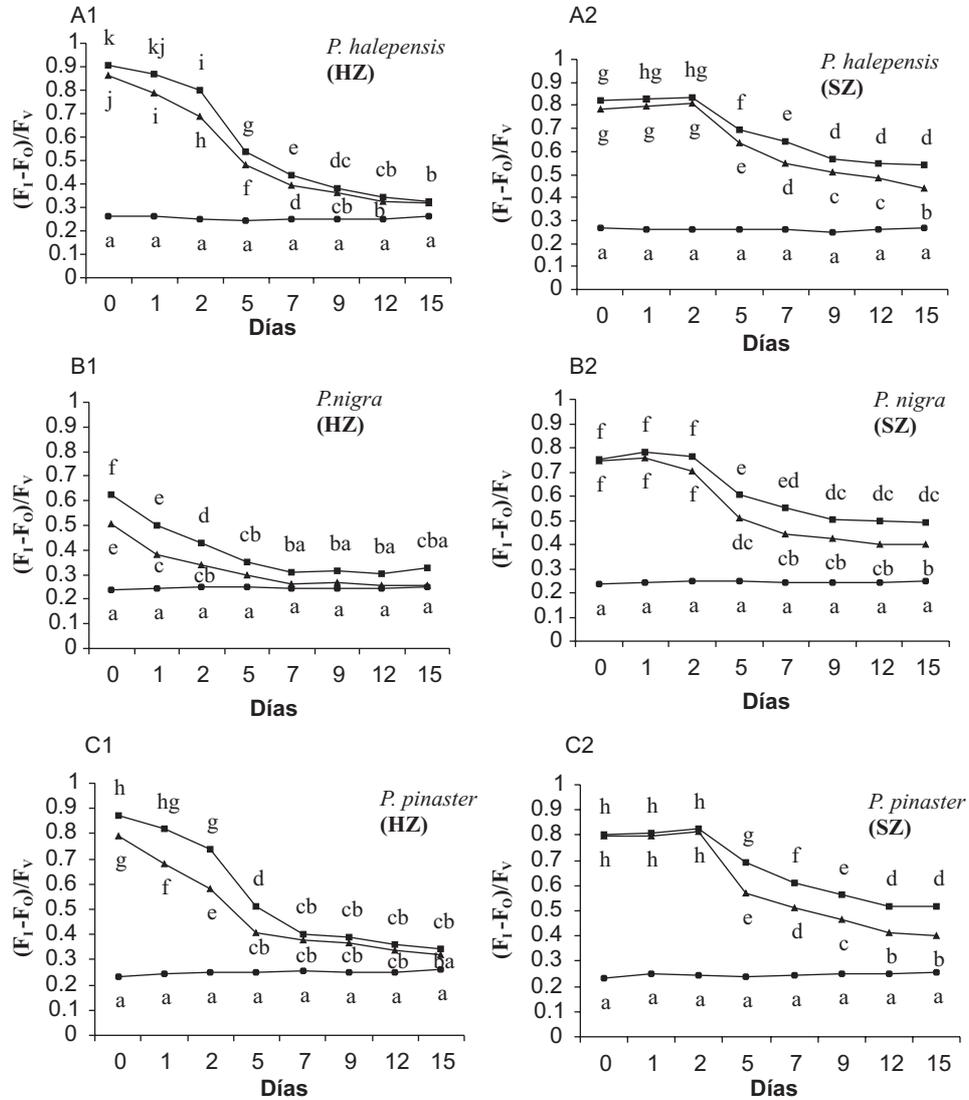
Las medidas de fluorescencia clorofílica se llevaron a cabo en las condiciones descritas por Ducruet *et al.* (1993) (Fuente de luz LS1 y detector de fluorescencia: FDP y FDC Hansatech). La señal recogida a 45° de la luz incidente se digitaliza mediante una tarjeta de conversión A/D, se almacena y se analiza mediante un programa de ordenador similar al descrito por Ducruet *et al.* (1984), que proporciona automáticamente los niveles  $F_0$  y  $F_p$ . El nivel  $F_I$  es el alcanzado en un tiempo prefijado después del inicio de la iluminación. La estimación de la inhibición fotosintética producida por los herbicidas se determina mediante la relación  $(F_I - F_0)/F_V$ , donde  $F_V$  es la fluorescencia variable ( $F_p - F_0$ ). Este parámetro refleja la reoxidación de  $Q_A^-$  por  $Q_B$  y el conjunto de plastoquinonas.

Las medidas de fluorescencia clorofílica se iniciaron al finalizar el tratamiento herbicida, tras someter a las plántulas a una hora de oscuridad que permite la detección de la fase rápida de la cinética de inducción de fluorescencia. Estas medidas se efectuaron sobre las primeras hojas caulinares y se repitieron 1, 2, 5, 7, 9, 12 y 15 días después del tratamiento.

Este parámetro se sometió a un análisis de la varianza de medidas repetidas en el tiempo con los factores especie, herbicida, dosis y ensayo, seguido de un test de Newman-Keuls.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los dos ensayos realizados por cada especie de pino y herbicida se observaron idénticas tendencias en la inhibición de la fotosíntesis medida a través del incremento de fluorescencia clorofílica. Las diferencias entre ensayos no fueron significativas ( $p < 0,05$ ) y por ello se han descrito los resultados medios de los dos ensayos.



**Fig. 1.**—Valores fluorescencia clorofílica  $(F_1 - F_0)/F_v$  en plántulas de *Pinus halepensis* (A), *P. nigra* (B) y *P. pinaster* (C) tratadas con hexazinona (1; HZ) y simazina (2; SZ) a dosis de 0 ppm (●); 2 ppm (▲) y 4 ppm (■).

[Los valores son media de 20 plantas. Los puntos marcados con la misma letra para cada especie y herbicida, no son significativamente diferentes mediante el test de Newman Keuls ( $P < 0,05$ )].

La Figura 1 muestra los valores medios de inducción de fluorescencia de plantas de tres especies de pino, tratadas con los herbicidas hexazinona y simazina a dos dosis de tratamiento 2 y 4 ppm y sus respectivos controles no tratados. Las medidas de fluorescencia clorofílica se representan mediante la relación  $(F_1 - F_0)/F_V$  que para los controles toma en todos los casos valores entre 0,2 y 0,3. Estos valores, en el momento de retirar el tratamiento herbicida, fueron del orden de 0,8 para las tres especies de pino tratadas con simazina a las dos dosis empleadas, lo que representa una fuerte inhibición de la actividad fotosintética (Fig. 1.- A2, B2, C2). En los tratamientos con hexazinona (Fig. 1.- A1, B1, C1) se producen diferencias entre las especies, *P. halepensis* y *P. pinaster* que muestran valores alrededor de 0,9 y *P. nigra* que alcanza valores entre 0,5 y 0,6, lo que indica una inhibición fotosintética parcial en esta última especie. Para este herbicida, el grado de inhibición alcanzado en el momento de finalizar el tratamiento, es diferente para las distintas dosis ensayadas.

En los tratamientos con simazina, el bloqueo de los centros activos por el herbicida se mantiene durante los dos días siguientes a la retirada de éste y sólo a partir del quinto día se produce un descenso en la inhibición, siendo más rápido en las plantas tratadas con 2 ppm que en las tratadas con 4 ppm. Así en *P. halepensis* (Fig. 1.- A2), los niveles de emisión de fluorescencia clorofílica son similares el día 5 después del tratamiento a dosis de 2 ppm a los de el día 7 a dosis de 4 ppm. Este mismo hecho se produce en *P. nigra* (Fig. 1.- B2) y de forma más acusada en *P. pinaster* (Fig. 1.- C2), en el que la inhibición producida por una dosis de 2 ppm, 5 días después del tratamiento, es igual a la producida por una dosis de 4 ppm, 9 días después del tratamiento.

El descenso en el nivel de inhibición de la fotosíntesis en los tratamientos con hexazinona es más rápido que en el caso de los de simazina, comienza en las tres especies en el momento de retirar el tratamiento herbicida, siendo apreciable un día después a la dosis más baja de las empleadas, 2 ppm. A la dosis más alta (4 ppm), la recuperación de la actividad fotosintética es apreciable un día después del tratamiento en *P. nigra* (Fig. 1.- B1) y dos días después del tratamiento en *P. pinaster* (Fig. 1.- C1) y *P. halepensis* (Fig. 1.- A1).

Al finalizar el ensayo 15 días después del tratamiento, sólo *P. nigra* a las dos dosis empleadas de hexazinona (Fig. 1.- B1) y *P. pinaster* a 2 ppm del mismo herbicida (Fig. 1.- C1) han destoxificado totalmente y han recuperado la actividad fotosintética con niveles de emisión de fluorescencia iguales a los del control. En los demás casos de tratamiento con hexazinona y en todos los casos de tratamiento con simazina no se ha alcanzado niveles similares a los del testigo. En los dos casos en que la planta ha recuperado los niveles de  $(F_1 - F_0)/F_V$  del testigo, esto se ha producido con una diferencia en el período de tiempo que necesita cada especie para alcanzar la destoxificación. *P. nigra* se encuentra completamente destoxificado el día 5 para dosis de 2 ppm y el día 7 para 4 ppm, mientras que en *P. pinaster* la destoxificación total se produce sólo para el tratamiento de 2 ppm el día 15.

En los tratamientos con simazina, ninguna de las tres especies de pino consiguió destoxificar este herbicida en los 15 días que duró el ensayo, ni siquiera para la dosis menor. Se observa una tendencia al mantenimiento de una inhibición media, que expresa una eficiencia de la fotosíntesis significativamente menor que en plantas control no tratadas (Fig. 1.- A2, B2, C2).

Perfiles de destoxificación similares a los de estas especies habían sido observados también en tratamientos con hexazinona de *P. taeda* (Johnson, Stelzer, 1991) y *P. pinea* (Villarroya *et al.*, 1997). Esta última especie llegó a destoxificar totalmente simazina a dosis de 2 ppm en 12 días (Villarroya *et al.* 1999).

La sensibilidad de las tres especies de pino al efecto de estos herbicidas ha sido similar en el caso de la simazina, pero diferente en el de la hexazinona. La menor inhibición que ha mostrado *P. nigra* por efecto de hexazinona tras retirar el tratamiento y su rápida destoxicación indican que es más tolerante que *P. halepensis* y *P. pinaster* a este herbicida, lo que concuerda con algunos ensayos de campo en los que se ha mostrado una elevada tolerancia en implantaciones de una o dos savias (Miller *et al.*, 1988; Ortega *et al.*, 1999). Fitotoxicidades diferentes entre especies de pinos se corresponden, al menos en los tratamientos con hexazinona, a diferencias en las tasas de transpiración de las especies, las cuales determinan la absorción y posterior translocación del herbicida (Wood *et al.*, 1992) y a diferencias en la velocidad de degradación de este herbicida en metabolitos menos fitotóxicos (McNeil *et al.*, 1984).

De los resultados obtenidos podemos deducir que para las especies y dosis estudiadas se produce una mejor recuperación de la actividad fotosintética, lo que significa una mayor tolerancia del árbol al herbicida, en los tratamientos con hexazinona que en los tratamientos con simazina, no existiendo diferencias en la respuesta de estas tres especies a simazina. En los tratamientos con hexazinona *P. nigra* es más tolerante que *P. pinaster* y *P. halepensis*.

### SUMMARY

#### Fluorescence induction in Pine. Response of *Pinus halepensis* Miller, *P. nigra* Arnold and *P. pinaster* Aiton to hexazinone and simazine herbicides

The first phases of the development of pines could be affected by weed competition. The use of herbicides is fundamental for weed control but herbicide treatment must be safe for pines. This work study the effect of two herbicides, hexazinone and simazine, over three pine species *Pinus halepensis*, *P. nigra* and *P. pinaster* by means of measures of the fast phase of the chlorophyll fluorescence induction kinetics. The study is conducted in early caulinar leaves of pine treated for 48 hours with doses of 2 and 4 ppm of each herbicide. Herbicide treatment and recovery of plants was done under hydroponics conditions in climatic chamber. *P. nigra* was more tolerant than *P. pinaster* and *P. halepensis* to hexazinone. There were no differences between species in simazine response. The three pine species show better recovery of photosynthetic activity in hexazinone treatments than in simazine treatments, indicating better tolerance of tree to hexazinone than to simazine.

**KEY WORDS:** Chlorophyll fluorescence  
Herbicides  
Hexazinone  
Simazine  
*Pinus halepensis*  
*Pinus nigra*  
*Pinus pinaster*

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANÓNIMO, 1991. Reglamento (CEE) num.2328/91 del Consejo, de 15 de julio de 1991, relativo a la mejora de la eficacia de las estructuras agrarias.
- AHRENS W.H., 1989. Uptake and action of metribuzin in soybeans (*Glycine max*) and two weed species as monitored by chlorophyll fluorescence. *Weed Science* 37, 631-638.
- AHRENS W.H., ARNTZEN C.J., STOLLER E.W., 1981. Chlorophyll fluorescence assay for the determination of triazine resistance. *Weed Science* 29, 316-322.
- ALI A., MCLAREN R.D., SOUZA MACHADO V., 1986. Chloroplastic resistance to triazine herbicides in *Sisymbrium irio* L. (wild mustard). *Weed Research* 26, 39-44.

- BOLHÀR-NORDENKAMPF H.R., ÖQUIST G., 1993. Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research. En: Photosynthesis and Production in a Changing Environment: a field and laboratory manual. Hall, D.O., Scurlock, J.M.O., Bolhàr-Nordenkamp, H.R., Leegood, R.C., Long, S.P., eds. Chapman & Hall, London, pp. 193-206.
- BOULD C., HEWITT E.J., 1963. Mineral nutrition of plants in soils and in culture media. En: A Treatise of Plant Physiology. Steward, F.C., ed. Academic Press, New York, pp. 15-120.
- CADAHIA E., DUCRUET J.M., GAILLARDON P., 1982. Whole leaf fluorescence as a quantitative probe of detoxification of the herbicide chlortoluron in wheat. *Chemosphere* 11 (4), 445-450.
- DUCRUET J.M., GAILLARDON P., VIENOT J., 1984. Use of chlorophyll fluorescence induction kinetics to study translocation and detoxication of DCMU-type herbicides in plant leaves. *Z. Naturforsch* 39c, 354-358.
- DUCRUET J.M., GASQUEZ J., 1978. Observation de la fluorescence sur feuille entière et mise en évidence de la résistance chloroplastique à l'atrazine chez *Chenopodium album* L. et *Poa annua* L. *Chemosphere* 8, 691-696.
- DUCRUET J.M., SIXTO H., GARCÍA-BAUDÍN J.M., 1993. Using chlorophyll fluorescence induction for a quantitative detoxification assay with Metribuzin and Chlorotoluron in excised wheat (*Triticum aestivum* and *Triticum durum*) leaves. *Pesticide Science* 38, 295-301.
- FERNÁNDEZ-CAVADA S., COSCULLUELA J., SOPEÑA J.M., ZARAGOZA C., 1995. Primeros resultados de un ensayo de herbicidas en vivero de *Pinus halepensis* y *P. pinaster*. Congreso de la Sociedad Española de Malherbología, Huesca, pp. 297-301.
- FROCHOT H., 1986a. Le désherbage chimique en pépinière forestière. *Revue Forestière Française* 3, 237-242.
- FROCHOT H., 1986b. Maîtrise chimique de la végétation indésirable en plantation forestière. *Revue Forestière Française* 3, 280-284.
- FROCHOT H., PICARD J.F., DREYFUS P.H., 1986. La végétation herbacée obstacle aux plantations. *Revue Forestière Française* 3, 271-279.
- HABASH D., PERCIVAL M.P., BAKER N.R., 1985. Rapid chlorophyll fluorescence technique for the study of penetration of photosynthetically active herbicides into leaf tissue. *Weed Research* 25, 389-395.
- JOHNSON J.D., STELZER H.E., 1991. Loblolly pine photosynthesis is enhanced by sublethal hexazinone concentrations. *Tree Physiology* 8, 371-379.
- KRAUSE G.H., WEIS E., 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 42, 313-349.
- MCNEIL W.K., STRITZKE J.F., BASLER E., 1984. Absortion, translocation and degradation of tebuthiuron and hexazinone in woody species. *Weed Science* 32, 739-743
- MILLER R.O., BLOESE P.D., HANOVER J.W., 1988. Screening of three-preemergence herbicides for intensive plantation management in Michigan. *Tree Plant Notes Us. Dep. Agric. For. Serv.* 39 (2), 13-18.
- MONTERO G., CANELLAS I., BACHILLER A., FINAT L., 1997. Ensayos de cultivo de planta de *Pinus pinea* L. en vivero y fertilización y aplicación de herbicidas en plantaciones de campo. *Montes* 49, 11-15.
- NORSWORTHY J.K., TALBERT R.E., HOAGLAND R.E., 1999. Chlorophyll fluorescence evaluation of agrochemical interactions with propanil on propanil-resistant barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*). *Weed Science* 47, 13-19.
- ORTEGA M., PEÑUELAS J.L., MONTERO G., GARCÍA-BAUDÍN J.M., 1999. Respuesta de *Pinus halepensis* Miller, *P. nigra* Arnold, *P. pinaster* Aiton y *P. pinea* L. a herbicidas: Resultados preliminares. *Montes* 55, 83-87.
- ORTEGA M., VILLARROYA M., MONTERO G., GARCÍA-BAUDÍN J.M., 2000 Respuesta de *Pinus halepensis* Mill. y *Pinus pinaster* Ait. a herbicidas en condiciones de vivero. *Invest. Agr.: Sist. Recur. For.* 9 (1), 137-145.
- PEÑUELAS J.L., OCAÑA L., DOMÍNGUEZ S., RENILLA I., 1995. Primeros ensayos sobre el control de la competencia herbácea en repoblaciones de terrenos agrícolas abandonados. Congreso de la Sociedad Española de Malherbología, Huesca, pp. 229-233.
- RICHARD E.P., GOSS J.R., ARNTZEN C.J., SLIFE F.W., 1983. Determination of herbicide inhibition of photosynthetic electron transport by fluorescence. *Weed Science* 31, 361-367.
- SHEETS T.J., CRAFTS A.S., DREVER H.R., 1962. Influence of soil properties on the phytotoxicities of the s-triazine herbicides. *J. Agric. Food Chem.* 10, 458-462.
- VILLARROYA M., CHUECA M.C., MONTERO G., GARCÍA-BAUDÍN J.M., 1997. Respuesta de *Pinus pinea* al herbicida hexazinona. I Congreso Forestal Hispano Luso. II Congreso Forestal Español, Pamplona, pp. 679-684.
- VILLARROYA M., CHUECA M.C., ORTEGA M., MONTERO G., GARCÍA-BAUDÍN J.M., 1999. Respuesta de *Pinus pinea* al herbicida simazina. Congreso de la Sociedad Española de Malherbología, Logroño, pp. 353-356.
- WOOD J.E., STEPHENSON G.R., HALL J.C., HORTON R.F., 1992. Selective phytotoxicity of hexazinone to *Pinus resinosa* and *Pinus banksiana*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 44 (2), 108-118.