

# CULTIVOS HIDROPONICOS DE *Araucaria angustifolia* (Bert.). O.K.

Cristobal Thews <sup>1</sup>  
Graciela Fernández <sup>2</sup>  
Teresa Argüelles y Andrés <sup>3</sup>

## SUMMARY

The aim of this work was to find an adequate salt nutrient composition medium (hydroponics), to grow plantlets obtained from seeds of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. K..

A medium that allowed the maintenance and slow growth of healthy plantlets was devised, so now we are able to study other parameters as nutrient salt doses, pH variations, effect of herbicides or other subproducts of human activity. We are specially interested in residuals of kits that still contain very aggressive chemicals.

We have been able to maintain the plantlets on a liquid substrate media for three years. We have follow the performance of N, P, K in leaves as modified by the compounds supplied and time. We have evidence of a gentisoid glicoside that could be a marker of the degree of stress of the plantlets.

**Key words:** Hydroponic medium, coumarins, glicosides, *Araucaria angustifolia* (Bert) O.K.

## RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue el encontrar el medio adecuado para poder cultivar en hidroponia sistemas vivos complejos como pueden ser plantines de árboles desarrollados de semilla, de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O.K. El objetivo fue conseguido y ello nos permite tener una herramienta por la que se puede controlar el medio ambiente de las raíces de un árbol, se pueden dosificar los nutrientes, modificar el pH, agregar venenos, herbicidas u otros compuestos, como jabones, o demás residuos de la actividad humana. En especial estamos interesados en verificar el impacto que pueden tener los residuos de los "kits" ya utilizados, que se componen de productos químicos muy agresivos. Además se puede evaluar el impacto de algunos compuestos que entran en la dieta humana como aditivos.

Hemos podido mantener plantines sin síntomas externos de estrés durante un largo periodo de tres años en hidroponia, y hemos podido monitorear

N, P, K, en las hojas en función del tiempo y de los compuestos suministrados a los plantines. Se han obtenido además buenas indicaciones sobre un glucósido del ácido gentísico que nos permitiría evaluar el grado de estrés del tejido debido al largo periodo de mantenimiento en el medio artificial.

**Palabras clave :** Cultivos hidropónicos, coumarinas, glucósidos, *Araucaria angustifolia* (Bert) O.K.

## INTRODUCCION

El crecimiento y desarrollo normal de una planta requiere de un aporte continuo de minerales. El análisis nutricional de las especies vegetales nos permite evaluar múltiples aspectos de la interacción de la planta con los elementos del medio, pero para estudiar la relación planta - suelo debemos controlar este último componente. La hidroponia o los cultivos hidropónicos nos permiten múltiples estudios causa - efecto, aislando variables específicas, de la relación planta - suelo.

En el caso que nos ocupa, se trata de obtener elementos de juicio que faciliten la identificación de deficiencias nutricionales, y al mismo tiempo estudiar los requisitos de la especie en estudio, de modo a prever su comportamiento o supervivencia en suelos con características diferentes a las que normalmente soporta.

La especie elegida, *Araucaria angustifolia*

1. Estudiante de Ingeniería Forestal. Fac. C. Ftales. UNaM. Misiones

2. Doctor en Ciencias Químicas. Laboratorio de Ciencias Básicas. U. Nac. de Lujan. Bs.As.

3. Master en Ciencias. Laboratorio de Fisiología Vegetal. Fac. C. Ftales. UNaM. Misiones.

, es una especie forestal, descrita como indígena de nuestra región Alto Paranaense, y considerada como uno de los árboles más importantes de la Argentina desde ese punto de vista. Alcanza los 40 m de altura con un diámetro máximo de 1,5 m. Su área natural se extiende desde Río Grande del Sur hasta Minas Gerais en Brasil, comprendiendo además la porción nordeste de Misiones ( Biloni, 1990 ).

No conociendo el comportamiento de esta especie en hidroponia, hemos tratado en primer lugar de encontrar el mejor sistema hidropónico y la concentración de sales adecuada para su mantenimiento y crecimiento en el medio artificial, para que tomándolo como referencia se pueda comenzar a modificar las variables, asegurándonos así de poder ligar los síntomas con las causas. Además se investigó la concentración foliar de los tres macronutrientes más importantes (nitrógeno, fósforo y potasio) durante la duración del experimento y se trató de monitorear posibles signos químicos de envejecimiento, como la aparición y el aumento con el tiempo de sustancias de carácter fenólico.

## MATERIALES Y METODOS

Plantines de *Araucaria angustifolia* obtenidos de semillas comerciales de la zona de Eldorado, Misiones, entre 20 a 25 cm de altura de copa, de tres a cuatro meses de edad, fueron extraídos con ayuda de agua de las macetas que los contenían, de forma a mantener intactas las raíces. Fueron lavados escrupulosamente de cualquier resto de tierra, y dispuestos en recipientes de vidrio de 25 litros de capacidad, sujeta su parte aérea a los lados de los mismos con la ayuda de pinzas de madera. Estas pinzas tenían uno de sus brazos más largo, que sirvió como soporte a la parte aérea de los plantines. La raíz se sumergió en una solución nutritiva cuya composición se detalla en el cuadro 1, adicionada con azul de metileno al 0,2% y cuyo pH se ajustó entre 5.6 y 6.0. Un aireador comercial como los utilizados en las peceras, se dispuso en cada uno de los tanques, contándose en total 10 tanques con 10 plantines cada uno.

Se evitó la incidencia del sol directo, la luz fue la natural que ingresaba por las ventanas, midiéndose en un día soleado, sin nubes, una irradiancia de  $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . La temperatura fue la del ambiente, manteniéndose sobre los  $24^{\circ}\text{C}$  en invierno y nocturna, y llegando a los  $30^{\circ}\text{C}$  durante los veranos. La humedad relativa promedio medida sobre los tanques, fue del 80%. El experimento tuvo una duración de tres años.

Las plantas se mantuvieron semi-aisladas del resto de los jardines y viveros y no hubo necesidad de aplicar productos para eliminar patógenos. El único cuidado en ese aspecto fue la adición de azul de metileno a las soluciones.

La absorción de las sales del medio líquido por las plantas se infirió en forma aproximada midiendo la concentración de nitrógeno presente en una alícuota de dicho medio, cada semana, por el método de Nessler. Cuando la concentración disminuía en 2 unidades mM, se cambiaba el medio totalmente, vaciando y desinfectando el tanque, y volviendo a llenar con agua destilada, los nutrientes, ajustando el pH, y el azul de metileno. Durante el procedimiento las plantas se mantenían con sus raíces sumergidas en agua corriente. Después de varios meses se determinó que cambiar la solución cada mes y medio era suficiente para mantener la concentración de nitrógeno, y solamente se efectuaba un análisis de nitrógeno de vez en cuando para control.

La altura de los plantines se midió cada dos meses con la misma regla, desde la base de la parte aérea (el cuello) del plantín al ápice dominante, sin mover el plantín del medio de cultivo. De las cien plantas disponibles se muestreó una vez cada dos meses hojas y corteza de una región que distaba entre 10 y 15 cm del ápice, de diez plantas al azar, procurando que en los subsiguientes muestreos no entraran las plantas ya muestreadas para evitar daño excesivo a las mismas.

La cantidad de clorofila en hojas se midió siguiendo el método colorimétrico para clorofila total descrito en el AOAC (1970): extracción de la clorofila con acetona adicionada de carbonato de sodio al 0.3 %, y midiendo la absorbancia de la solución resultante a 660 nm.

En el tejido de las hojas se determinaron nitrógeno, fósforo y potasio. El nitrógeno total se determinó por microkjeldhal modificado para incluir nitratos según Chapman y Pratt (1961). El fósforo se determinó según los mismos autores por el método del azul de molibdeno utilizando la hidroquinona y el sulfito de sodio como reductores, leyendo la absorbancia a 625 nm. El potasio disolviendo la ceniza de las hojas en HCl 6N, diluyendo 5:25 para fotometría de llama (Chapman y Pratt, 1961).

En muestras de corteza del tronco de 2,5 gr de peso fresco, extraídas en tiras finas de distintas plantas a fin de causar el menor daño posible, finamente trozadas y congeladas inmediatamente, se determinaron fenoles totales mediante extracción a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 72 h, en 50% etanol, en una proporción 1:3 p:v (Feldman y Hanks, 1979). 50 a 100  $\mu\text{l}$  de extracto fueron sembrados sobre cromatofolios de 20 x 20 de silica gel, que fueron desarrollados con n-butanol saturado de agua, a  $26^{\circ}\text{C}$ . Después del desarrollo, los cromatogramas fueron secados al aire, y observados bajo luz UV de 366 nm. Al espolvorear las placas con una solución tamponada de borato de sodio pH 8.7 se intensificó la fluorescencia azul violeta, haciendo más fácil la detección, y la medida del Rf, sobre todo en los

primeros tiempos del experimento.

La zona fluorescente de  $R_f = 0.27 - 0.30$  fue marcada y removida del cromatograma, disuelta en acetato de etilo - ácido acético - agua ( 5:1:1, v:v), centrifugada a baja velocidad durante 8 minutos para eliminar los restos de silica gel, separado el sobrenadante, secado con un ligero vacío a 40°C y redisoluto en 3 ml de etanol al 50%, y medida la absorbancia a 310 nm (Schwarz, 1970 ).

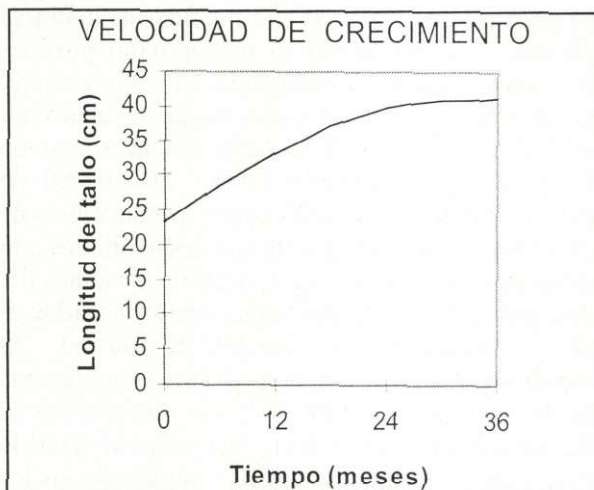
Para la determinación cuantitativa de fenoles los componentes individuales se separaron sobre papel Whatman n° 1, se disolvieron y analizaron por el método Folin - Ciocalteu, utilizando ácido felúrico para la curva patrón. La absorbancia del complejo Folin - fenol se determinó a 660 nm, (Feldman, Hanks y Garnsey, 1979 ).

## RESULTADOS Y DISCUSION

En el cuadro 1 se puede apreciar la composición final de sales minerales y de vitaminas del medio hidropónico. Las sales son las propuestas por Murashige y Skoog en 1962. Llegar a establecer las cantidades de las mismas nos insumió seis meses de trabajo y la muerte de numerosos plantines. Una vez establecida esta formulación tuvimos plantines que sobrevivieron durante tres años en hidroponia, sobreviviendo los 100 plantines con los que comenzamos el experimento.

El crecimiento fue muy lento, y no comparable al crecimiento en condiciones naturales. El promedio de la altura de los cien plantines al comienzo del experimento fue de 23,3 cm, habiendo alcanzado a los tres años una altura promedio de 41,2 cm. Aunque partimos de una población elegida bastante uniforme, al final de la experiencia se notaron grandes diferencias en cuanto al tamaño entre los plantines, aún los que habían "cohabitado" durante los tres años en el mismo tanque, siendo este comportamiento similar al observado en los viveros, y debido aparentemente a diferencias genéticas entre los individuos.

Figura 1.-



El incremento promedio en altura de los tres años fue de 17,9 cm, aumentando en razón de 5,96 cm/ año. La velocidad de crecimiento fue mayor al principio del experimento, pareciendo que se podía haber alcanzado una meseta de seguir el experimento ( fig 1).

No se pudo mejorar la velocidad del crecimiento. Cuando al establecer el experimento quisimos aumentar la velocidad del crecimiento con aumentos en la cantidad de sales minerales, pequeños incrementos de estas, resultaron tóxicos para los plantines, evidenciándose esto en una debilidad del tejido, sobre todo en la zona de diferenciación entre el tallo y la raíz. La cutícula debilitada permitía el ingreso de patógenos que causaban la muerte del plantín, esto se puso de manifiesto en los primeros ensayos tendientes a encontrar una formulación que permitiera la supervivencia, y el crecimiento óptimo.

La cantidad de clorofila varió en un 5% a lo largo de todo el experimento ( ver fig 2). Habiendo dado un valor arbitrario del 100% a la absorbancia medida en el primer muestreo ( cuando los plantines salieron del vivero), nos encontramos con valores superiores en un 5% después de 6 meses en hidroponia, subsecuentemente este valor disminuyó ligeramente y después volvió a aumentar. El color del follaje fue en todo momento de un verde intenso.

El nitrógeno total expresado como porcentaje sobre materia seca tampoco se modificó en toda la duración del experimento ( fig. 2).

El potasio también expresado como porcentaje sobre materia seca, aumentó ligeramente durante los últimos 12 meses del experimento (fig 2).

El fósforo, debido seguramente a la presencia de fosfatasas ácidas, aumentó paulatinamente hasta alcanzar un 50% sobre los valores originales ( fig 2).

El color de los extractos etanólicos varió desde un verde pálido en los primeros muestreos a un rojo intenso a medida que transcurría el tiempo.

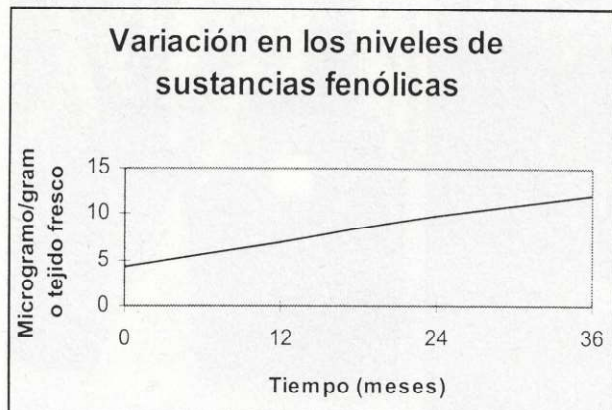
Figura 2.-



Estos resultados fueron consistentes con los datos cromatográficos, ya que los extractos coloreados de rojo intenso contenían mayor cantidad de sustancias fenólicas. Desde que fueron medibles, con el ensayo de Folin - Ciocalteu (seis meses a partir del inicio) hasta el final del experimento, se constató un incremento creciente en la cantidad de fenoles medidos como  $\mu\text{g/g}$  de tejido fresco ( fig 3).

La cromatografía mostró unas bandas fluorescentes azul violeta de  $R_f = 0.40 - 0.45$ ,  $R_f = 0.47 - 0.56$ , y  $R_f = 0.68 - 0.75$ , tenues al principio

Figura 3.-



debiéndose utilizar borato de sodio para poder observarlas. Se fueron intensificando con el tiempo, y se deberían a la presencia y acumulación de cumarinas en los tejidos ( Feldman y Hanks, 1979 ).

A partir de los 20 meses apareció en todos los cromatogramas una banda adicional de  $R_f = 0.27 - 0.30$ , fluorescente, de color azulado. Separada esta del conjunto, se determinó un pico de absorbancia a 310 nm, coincidiendo en todas sus características con un glucósido, ester monómero del ácido gentísico, que suele aparecer en respuesta a situaciones de estrés, como ante infecciones por patógenos (Feldman y Hanks, 1979 ), y que parece estar marcando un envejecimiento del tejido.

En ningún momento las plantas mostraron síntomas externos de deficiencias nutricionales.

Las raíces no fueron muestreadas, pero aparecían con un buen crecimiento, sanas, sin pelos radiculares, con una caliptra bien definida, presentando una estructura no en forma de retículo, sino más bien con pocas raíces pero muy largas y relativamente gruesas. Dicha distribución externa sería debida al medio de cultivo ( Mc Cully, 1995, Bar - Yosef, 1989 ).

## CONCLUSIONES

En primer lugar nos parece un aporte importante el haber podido mantener durante un período de tres años, nuestras gimnospermas en condiciones hidropónicas. Disponemos pues de

un medio en el cual los síntomas de estrés y de envejecimiento aparecen al cabo de 12 a 18 meses, por lo que se posibilita el estudio de carencias dentro del primer año de vida en condiciones de hidroponía.

Sabemos además como mantener el medio dentro del intervalo de concentraciones definidas sin necesidad de monitoreo, siempre manteniendo las mismas condiciones ambientales del experimento y con la misma especie, disponemos de un "marcador" la presencia del gentisil glucósido que nos permitiría, antes que se pueda hacer visualmente, un control sobre el estado de estrés del tejido.

Podemos ahora efectuar estudios de la influencia del pH sobre el crecimiento y el metabolismo de los plantines de Araucaria, estudios de salinidad, de toxicidad de productos agropecuarios, o cualquier otro cambio químico que pueda tener influencia sobre el proceso de viabilidad de nuestros plantines de Araucaria. Esto se torna importante a la hora de pensar en plantas transformadas cuyas respuestas hacia muchos factores van a tener que ser estudiadas antes de arriesgar su introducción en el campo.

## BIBLIOGRAFIA

- AOAC, 1970. Official Methods of Analysis. W. Horwith Ed., Washington , D.C. 20044
- Bar - Yosef y Lombert, J.R. 1989. Corn and cotton root growth in response to osmotic potential and oxygen and nitrate concentrations in nutrient solutions. In: Harley and Scott Russell eds., The soil root interface. Pp 280 - 299. London Acad. Press.
- BILONI, J.S. 1990. Árboles autóctonos argentinos. Editorial Argentina B.A. .
- CHAPMAN, H, D. y Pratt, P.F. 1961. Methods of analysis for soils, plants and waters. Univ. of California. Riverside.
- FELDMAN, A.W. y Hanks, R.W. 1979. Identification and quantification of phenolics in the leaves and roots of healthy and exocortis infected Citrus. Proc. of the IOCV. pp. 292 - 299.
- FELDMAN, A.W., Hanks, R.W. y Garnsey, S.M. ,1979. Localization and detection of Coumarins in exocortis virus infected Citron. Proc. Of the IOCV. pp 239 - 243.
- MCCULLY, M. 1995. How do real roots work?. Plant Physiology, vol 109, pp. 1 - 6.
- SCHWARZ, R.E. 1970. Seasonal graft - transmissibility and quantification of gentisyl glucoside marker of citrus greening in the bark of infected trees. Phytophylactica, vol. 2, pp: 115 - 120.

Foto 1 y 2: Vista total y parcial del ensayo. Las persianas se bajaron al tomar la fotografía para eliminar la posible interferencia visual con la vegetación exterior.

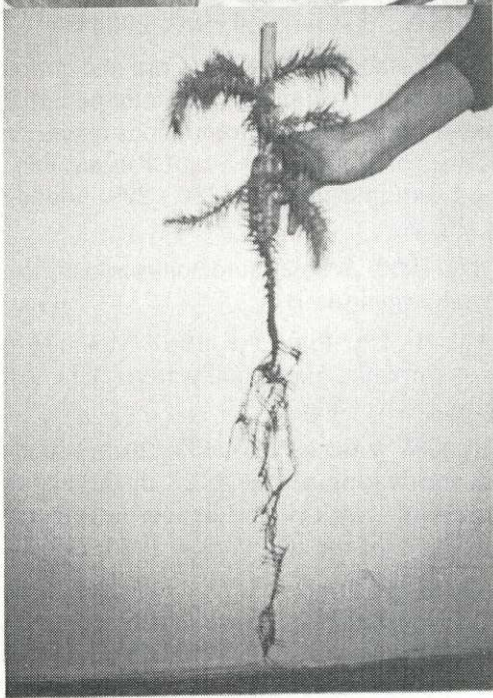


Foto 3: Detalle de un plantín. Obsérvese la longitud de las raíces que exceden el marco de la fotografía.

Cuadro 1. Composición final del medio hidropónico para *A. angustifolia*

Nutrientes y Adenda	Concentración (mM)
$\text{NH}_4 \text{NO}_3$	6.4
$\text{KNO}_3$	4.2
$\text{MgSO}_4$	$1.28 \times 10^{-1}$
$\text{MnSO}_4$	$4.66 \times 10^{-3}$
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$1.24 \times 10^{-3}$
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	$4.17 \times 10^{-6}$
$\text{Cl}_2\text{Ca} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$1.24 \times 10^{-1}$
IK	$2.08 \times 10^{-4}$
$\text{Cl}_2\text{Co} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$4.36 \times 10^{-6}$
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	$5.2 \times 10^{-2}$
$\text{H}_3\text{BO}_3$	$4.16 \times 10^{-3}$
$\text{MoO}_4\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$4.30 \times 10^{-5}$
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$8.34 \times 10^{-6}$
EDTA $\text{Na}_2$	$9.20 \times 10^{-6}$
Acido nicotínico	$6.83 \times 10^{-4}$
Piridoxina hidroclicrica	$4.76 \times 10^{-4}$
Tiamina hidroclicrica	$6.47 \times 10^{-5}$
Azul de metileno	0.2%