

EL YODO AUMENTA EL CRECIMIENTO Y LA CONCENTRACIÓN DE MINERALES EN PLÁNTULAS DE PIMIENTO MORRÓN

IODINE INCREASES THE GROWTH AND MINERAL CONCENTRATION IN SWEET PEPPER SEEDLINGS

Crispín Cortés-Flores¹, M. Nieves Rodríguez-Mendoza^{1*}, Adalberto Benavides-Mendoza³,
J. Luis García-Cué¹, Mario Tornero-Campante², Prometeo Sánchez-García¹

¹Edafología y Estadística. Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados. 56230. Montecillo, Estado de México. (marinie@colpos.mx), ²Estrategias para el desarrollo agrícola regional (EDAR). Campus Puebla. Colegio de Postgraduados. ³Horticultura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo Coahuila, México.

RESUMEN

El yodo es un elemento no esencial para las plantas pero induce respuestas positivas en el crecimiento y metabolismo. El objetivo de este estudio fue determinar la factibilidad de uso del yodo (como KI) por vía foliar para promover el crecimiento de las plántulas de pimiento morrón (*Capsicum annuum*). La hipótesis fue que la aplicación de este elemento elevará la tasa de crecimiento y el contenido de antioxidantes en las plántulas. El diseño experimental fue completamente al azar con seis tratamientos (0, 10, 15, 30, 45, 50 μM KI L^{-1}) y con tres repeticiones; la unidad experimental fue una charola de 50 cavidades. Los datos se analizaron con un ANDEVA y las medias se compararon con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Las aplicaciones de KI por vía foliar fueron cuatro: la primera al aparecer las primeras hojas, la segunda 7 d después, y la tercera y cuarta en intervalos de 14 d. En los muestreos se cosecharon 10 plántulas por tratamiento y se midió altura de plántula, diámetro de tallo, área foliar y peso seco. Con esos datos se calcularon los índices de crecimiento: tasa de asimilación neta, tasa de crecimiento absoluto, tasa de crecimiento relativo y área foliar específica. También se midieron la actividad antioxidante, la concentración de yodo y otros elementos minerales. Los resultados mostraron aumentos significativos en la altura, diámetro de tallo y peso seco con la aplicación de 10 y 15 μM de KI. La actividad antioxidante y la concentración de yodo en las plántulas fue proporcional a la concentración de KI aplicado, mientras que la concentración de otros elementos tuvo respuesta positiva sólo con 10 y 15 μM de KI.

Palabras clave: Plántulas, índices de crecimiento, pimiento morrón, almácigos.

* Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: agosto, 2015. Aprobado: abril, 2016.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 50: 747-758. 2016.

ABSTRACT

Iodine is a non-essential element for plants, despite inducing positive responses in their growth and metabolism. The aim of this study was to determine the feasibility of the use of iodine (as KI) via the leaves to promote growth of sweet pepper (*Capsicum annuum*) seedlings. The hypothesis was that applying this element will increase the growth rate and the content of antioxidants in seedlings. A completely randomized experimental design was carried out with six treatments (0, 10, 15, 30, 45, 50 μM KI L^{-1}) and three repetitions; the experimental unit was one tray with 50 cavities. Data were analyzed with an ANOVA and averages were compared with a Tukey test ($p \leq 0.05$). Four applications of KI were performed on the leaves: the first application when the first leaves appeared; the second one, 7 d later; and the third and fourth, in 14 d intervals. When taking samples, 10 seedlings were harvested for every treatment, in which their height was measured, along with the stem diameter, foliar area, and dry weight. Using these data, we calculated the growth indices: net assimilation rate, absolute growth rate, relative growth rate, and specific foliar area. The antioxidant activity and concentration of iodine and other mineral elements were also measured. Results showed significant increases in height, stem diameter, and dry weight with the application of 10 and 15 μM of KI. Antioxidant activity and iodine concentration in seedlings was proportional to the concentration of KI applied, whereas the concentration of other elements responded positively only with 10 and 15 μM of KI.

Key words: Seedlings, growth indices, sweet pepper, nurserybeds.

INTRODUCCIÓN

Hasta ahora no se conoce una función metabólica específica del yodo en las plantas terrestres (Kabata-Pendias, 2011). Sin embargo, el yodo induce en las plantas una mayor presencia de antioxidantes y aporta un aumento en la tolerancia a algunos factores adversos (Blasco *et al.*, 2008; Blasco *et al.*, 2011; Gupta *et al.*, 2015). En especies marinas como *Laminaria digitata* (kelp) el proceso de inducción de tolerancia está relativamente bien entendido, y la acumulación celular o volatilización hacia la atmósfera de este elemento está relacionado con el nivel de estrés oxidativo. Bajo condiciones de producción alta de especies reactivas del oxígeno (ROS) el yodo es volatilizado, mientras que con baja concentración de ROS el yodo es almacenado para estar disponible si aumenta el estrés (Kupper *et al.*, 2008). Venturi (2011) propuso la hipótesis de que el yodo fue uno de los primeros antioxidantes usados por los organismos fotosintéticos. Según La Barre *et al.* (2010), las algas marinas usan yodo como un antioxidante durante estrés oxidativo, lo cual pudiera ser similar en las plantas terrestres. Sin embargo, el uso del yodo ha sido poco investigado en la práctica agrícola.

Los efectos positivos de la aplicación de yodo en las plantas terrestres se mantienen al usarlo en bajas concentraciones, pero ocurre toxicidad al aplicar en las plantas más allá de ciertas concentraciones (Caffagni *et al.*, 2011; Landini *et al.*, 2011). Estos umbrales de beneficio y de toxicidad son variables y dependen de la especie (Kabata-Pendias, 2011).

En México, el pimiento morrón (*Capsicum annuum* L.) es el cuarto cultivo con mayor relevancia (SIAP, 2010). La aplicación de yodo en este cultivo pudiera tener ventajas como aumento en la concentración de yodo en las plantas, para propósitos de biofortificación y mejora en su capacidad de tolerancia frente al estrés por el aumento en la capacidad antioxidante. Sin embargo, no hay información publicada acerca de las respuestas del pimiento a las aplicaciones de este elemento. Por lo tanto, se requieren estudios para conocer las respuestas de crecimiento y calidad nutricional de la planta a la aplicación de yodo.

El objetivo de este estudio fue determinar la factibilidad de uso del yodo por vía foliar para promover el crecimiento de las plántulas de pimiento morrón.

INTRODUCTION

Iodine has not yet been found to have a specific metabolic function on terrestrial plants (Kabata-Pendias, 2011). However, iodine induces a greater presence of antioxidants in plants, providing an increase in tolerance to some adverse factors (Blasco *et al.*, 2008; Blasco *et al.*, 2011; Gupta *et al.*, 2015). In marine species such as *Laminaria digitata* (Kelp) the tolerance induction process is relatively well understood, and the cell accumulation or volatilization of this element towards the atmosphere is related to the level of oxidative stress. Under conditions of high production of reactive oxygen species (ROS), iodine is volatilized, whereas with a low ROS concentration, iodine is stored for availability in case stress increases (Kupper *et al.*, 2008). Venturi (2011) proposed the hypothesis that iodine was one of the first antioxidants used by photosynthetic organisms. According to La Barre *et al.* (2010), iodine is used by sea algae as an antioxidant during oxidative stress, which could be similar in terrestrial plants. However, the use of iodine in agricultural practice has been scarcely investigated.

The positive effects of the application of iodine in terrestrial plants are maintained when applying it in low concentrations and toxicity occurs when applying iodine in plants above certain concentrations (Caffagni *et al.*, 2011; Landini *et al.*, 2011). These thresholds of benefit and toxicity are variable, depending on the species (Kabata-Pendias, 2011).

In Mexico, the sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) is the fourth most important crop (SIAP, 2010). Applying iodine on this crop could bring advantages such as an increase in the concentration of iodine in the plants, for biofortification purposes and improving their capacity of tolerance to stresses caused by the increase in antioxidant capacity. However, there is no available information published about responses of sweet pepper plants to the applications of this element. Therefore studies are necessary to provide answers on the growth responses and nutritional quality of the due to iodine applications.

The aim of this study was to determine the feasibility of the use of iodine via the leaves to promote the growth of sweet pepper seedlings. The hypothesis was that the application of this element will increase the growth rate and the content of antioxidants in the seedlings.

La hipótesis fue que la aplicación de este elemento aumentará la tasa de crecimiento y el contenido de antioxidantes en las plántulas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y condiciones de crecimiento

El experimento se realizó en el campus Montecillo del Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México. Los almácigos para la germinación de la semilla y el crecimiento de las plántulas se establecieron en cámara de ambiente controlado con temperatura de 23 a 25 °C y humedad relativa de 50 %, con periodo de luz de 14 h (pares fluorescentes) y 10 h de oscuridad. Para los almácigos se emplearon charolas de plástico de 50 cavidades. Cada charola se llenó con el sustrato peat-moss Sungro®, se colocó una semilla por cavidad y se cubrió con una fina capa de vermiculita. La variedad de pimiento morrón sembrada fue Sidenca de la compañía Enza Zaden. Los riegos se realizaron diario usando una regadera manual para mantener la humedad del sustrato. La nutrición se realizó con solución de Steiner al 25 % [0.147 mM Ca(NO₃)₂, 0.034 mM KH₂PO₄, 0.076 mM K₂SO₄, 0.176 mM de KNO₃, 0.068 mM MgSO₄·7 H₂O, micros, pH 5.5]; inició al presentarse las primeras hojas verdaderas; 7 d después la concentración aumentó a 50 % y 7 d después a 75 % hasta el trasplante.

Aplicación foliar de yodo

Cuando las plántulas presentaron las primeras hojas verdaderas se realizaron tres aplicaciones foliares de yodo, con intervalos de 14 d. Los tratamientos fueron 10, 15, 30, 45 y 50 μM KI L⁻¹ y un testigo (0 yodo), con tres repeticiones. Las aspersiones foliares se hicieron con un aspersor de ultra bajo volumen fuera de la cámara de crecimiento para evitar contaminación entre tratamientos. La unidad experimental fue una charola con 50 cavidades, y el diseño experimental fue completamente al azar.

Medición de variables durante el desarrollo del cultivo

Los muestreos se hicieron 7 d después de cada aplicación foliar del yodo, recolectando 10 plántulas por unidad experimental para medir: altura de planta (cm), desde el punto cero sobre la superficie del sustrato hasta el ápice; diámetro de tallo (mm) con un vernier digital marca Truper; área foliar (cm²) por el método de planimetría (escaneo y análisis de imágenes y estimación de la longitud y anchura de la hoja), por el método reportado en Melgarejo *et al.* (2011). Las plántulas se secaron 72 h en un horno de circulación continua a 70 °C y se pesaron para obtener peso seco en g.

MATERIALS AND METHODS

Plant material and growth conditions

The experiment was carried out in campus Montecillo, Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de Mexico. The seedbeds for the seed germination and plantlet growth were established in a controlled environment chamber, with temperatures between 23 and 25 °C and a relative humidity of 50 %, with a light period of 14 h (fluorescent lamps) and 10 h of darkness. For the seedbeds, we used plastic trays with 50 cavities. Each tray was filled with the substrate peat-moss Sungro®; one seed was placed in each cavity and covered with a thin layer of vermiculite. The sweet pepper variety planted was Sidenca, of Enza Zaden company. Irrigation was carried out daily using a hand-held sprinkler to maintain the humidity of the substrate. Nutrition was provided with Steiner solution at 25 % [0.147 mM Ca(NO₃)₂, 0.034 mM KH₂PO₄, 0.076 mM K₂SO₄, 0.176 mM KNO₃, 0.068 mM MgSO₄·7 H₂O, micronutrients, pH 5.5; it began once the first true leaves appeared, 7 d later, the concentration was increased to 50 % and 7 d later, to 75 % until transplant.

Foliar application of iodine

When seedlings presented the first true leaves, the foliar applications with iodine were performed, with intervals of 14 d. The treatments were 10, 15, 30, 45, and 50 μM KI L⁻¹ and a control (0 iodine), with three repetitions. Foliar applications were sprayed using a low-volume spray outside the growth chamber to avoid contamination between treatments. The experimental unit was a tray with 50 cavities, and the experimental design was completely randomized.

Measurement of variables during crop development

Samples were obtained 7 d after each foliar application of iodine, collecting 10 seedlings per experimental unit to measure: plant height (cm), from point zero on the surface of the substrate to the apex; stem diameter (mm), with a digital Truper brand vernier; foliar area (cm²), obtained by planimetry (scanning and analysis of images and estimation from the length and width of leaf), using the method reported by Melgarejo *et al.* (2011). Seedlings were dried for 72 h in a continuous circulation oven at 70 °C and weighed to obtain dry weight in g.

Determining growth indexes

Data on dry matter (DM) and foliar area were used to determine growth indexes for sweet pepper: net assimilation

Determinación de índices de crecimiento

Los datos de materia seca (MS) y área foliar se usó para determinar de los índices de crecimiento del pimiento: tasa de asimilación neta ($TAN = \ln A_2 - \ln A_1 / t_2 - t_1$); tasa de crecimiento absoluto ($TCA = P_2 - P_1 / t_2 - t_1$); tasa de crecimiento relativo ($TCR = \ln P_2 - \ln P_1 / t_2 - t_1$); área foliar específica ($AFE = AF / \text{biomasa de hoja}$). $\ln A =$ logaritmo natural de área foliar (cm^2); $t =$ tiempo (d); $P =$ peso seco total (g); $\ln P =$ logaritmo natural de MS total (g) (Amaro *et al.*, 2004).

Determinación de la actividad antioxidante total (método del DPPH)

La actividad de antioxidantes totales se determinó por el método del DPPH (Scherer y Texeira 2009). La reacción se basa en una disminución de color que ocurre cuando un electrón de un átomo de nitrógeno en DPPH es reducido por recibir un átomo de hidrógeno de los compuestos antioxidantes. En 10 repeticiones por tratamiento se maceró el material vegetal, ya homogenizado se pesaron 100 mg y se colocaron en frascos de 2 mL. Se agregaron 1.5 mL de etanol al 60 % y reposaron 24 h, las muestras se centrifugaron 15 min a 9 000 rpm, se tomaron 400 μL del sobrenadante de cada muestra y se colocaron en un frasco de 2 mL para agregar 600 μL de metanol al 80 % y 1 mL de la solución de DPPH. Las muestras reposaron 15 min y la lectura se hizo en el espectrofotómetro a 517nm. La lectura de cada muestra se repitió a los 30 y 60 min. Los resultados se expresan como % del DPPH inhibido.

Contenido de yodo y minerales en plántulas

El contenido de yodo se midió por la técnica de cenizas alcalinas (Fisher *et al.* 1986). Las 10 plántulas de pimiento muestreadas por tratamiento se colocaron 72 h en horno de circulación continua a 70 °C, se molieron y pesaron 0.5 g del tejido vegetal seco. Las muestras se colocaron en crisoles de porcelana, se agregó KOH y KNO_3 , y se pusieron 3 h en una mufla a 580 °C, se enfriaron a temperatura ambiente y las cenizas se pasaron a tubos cónicos para ser extraídas con KOH. Las cenizas de los tubos se centrifugaron 15 min a 7 200 rpm. Luego, 1 mL del sobrenadante se decantó y aforó a 10 mL con KOH 2M y se hicieron las lecturas para cuantificar de yodo en el equipo de espectroscopia de emisión atómica de inducción por plasma (ICP-OES, Varian 725-OES, Australia).

El contenido de P, K, Ca, Mg, S, B, Cu, Fe, Mn y Zn en la parte aérea, se analizó mediante la técnica de digestión húmeda y se leyó en el ICP, y el N se determinó con el método Kjeldahl (Bremner, 1965).

rate ($TAN = \ln A_2 - \ln A_1 / t_2 - t_1$); absolute growth rate ($TCA = P_2 - P_1 / t_2 - t_1$); relative growth rate ($TCR = \ln P_2 - \ln P_1 / t_2 - t_1$); specific leaf area ($AFE = AF / \text{leaf biomass}$). $\ln A =$ natural foliar area logarithm (cm^2); $t =$ time (d); $P =$ total dry weight (g); $\ln P =$ natural logarithm of total DM (g) (Amaro *et al.*, 2004).

Determining total antioxidant activity (DPPH method)

The total antioxidant activity was determined using the DPPH method (Scherer and Texeira 2009). The reaction is based on a reduction in color that takes place when the electron of a nitrogen atom in DPPH is reduced by receiving a hydrogen atom from the antioxidant compounds. In 10 repetitions per treatment, the plant material was softened. Once it was homogenized, 100 mg were weighed and placed in 2 mL microtubes. We added 1.5 mL of ethanol at 60 % and let it settle for 24 h. Samples were centrifuged for 15 min at 9 000 rpm, 400 μL of the supernatant were taken from each sample and placed in a 2 mL microtube to add 600 μL of methanol at 80 % and 1 mL of the DPPH solution. The samples were settled for 15 min and a reading was taken on the spectrophotometer at 517nm. The reading of each sample was repeated after 30 and 60 min. The results are expressed as a % of the DPPH inhibited.

Content of iodine and minerals content in seedlings

The iodine content was determined using the alkaline ash technique (Fisher *et al.* 1986). The ten seedlings sampled for each treatment were placed in a continuous circulation oven at 70 °C for 72 h, ground, and 0.5 g of the dry plant tissue were weighed. The samples were placed in porcelain crucibles, KOH and KNO_3 were added, the crucibles were placed in a muffle at 580 °C for 3 h, they were then cooled at room temperature and the ashes were transferred to conical flasks for extraction with KOH. The ashes of the tubes were centrifuged at 7200 rpm for 15 min. Finally, 1 mL of the supernatant decanted and graduated at 10 mL with KOH 2M and readings were taken for quantification of iodine in the inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES, Varian 725-OES, Australia).

The contents of P, K, Ca, Mg, S, B, Cu, Fe, Mn, and Zn in the aerial section were analyzed using the humid digestion technique and read in the ICP, and N was determined using the Kjeldahl method (Bremner, 1965).

Statistical analysis

The experimental design was completely randomized with six treatments and three repetitions per treatment. Data were

Análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente al azar con seis tratamientos, tres repeticiones por tratamiento. Los datos fueron analizados mediante un análisis de varianza y la comparación de medias se hizo con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

analyzed using an analysis of variance and means comparison was carried out using Tukey test ($p \leq 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Medición del desarrollo del cultivo

Las plántulas de pimiento morrón mostraron una respuesta significativa ($p \leq 0.05$) a las aplicaciones foliares de yodo en altura de planta, diámetro de tallo, área foliar y MS para cada tratamiento. La altura aumentó con la aplicación foliar de yodo ($10 \mu\text{M L}^{-1}$) y fue diferente los otros tratamientos (Cuadro 1; $p \leq 0.05$). Los resultados muestran que al aumentar la concentración de yodo disminuyó la altura de la plántula y en las concentraciones más altas se observaron los bordes de las hojas con síntomas de toxicidad. La respuesta positiva en la altura de la planta podría ser por un efecto antioxidante del yodo, lo cual permitiría a la planta una mayor adaptabilidad al entorno de crecimiento. Este efecto antioxidante fue mencionado por Venturi (2011), pero depende de la

RESULTS AND DISCUSSION

Measuring crop development

The sweet pepper seedlings showed a significant response ($p \leq 0.05$) to the foliar iodine applications for plant height, stem diameter, foliar area, and DM for each treatment. Height increased with the foliar iodine application ($10 \mu\text{M L}^{-1}$), and it was different to the other the treatments (Table 1; $p \leq 0.05$). The results show that increasing the concentration of iodine reduced plant height and, at the highest concentrations, the edges of the leaves displayed symptoms of toxicity. The positive response in plant height could be due to an antioxidant effect of iodine, which would help the plant adapt to the growth environment. This antioxidant effect was mentioned by Venturi (2011), although it depends on the concentration of iodine in the growth medium, since it is toxic at a higher concentration (Caffagni *et al.*, 2011; Landini, *et al.*, 2011). The same response was found in onion (*Allium cepa L.*), carrot (*Daucus carota L.*), celery (*Apium graveolens*

Cuadro 1. Efecto de seis dosis de KI aplicadas al follaje de plántulas de pimiento morrón sobre la altura de plántula, diámetro de tallo, área foliar y producción de materia seca.

Table 1. Effect of six doses of KI applied on the foliage of sweet pepper seedlings on plant height, stem diameter, foliar area, and production of dry matter.

Aplicación foliar	Altura de plántula (cm)	Diámetro de tallo (mm)	Área foliar (cm ²)	Materia seca (g)
Testigo 0 μM	12.81 c	2.319 c	68.43 c	0.92 d
Yodo 10 μM	17.63 a	3.056 a	93.06 a	1.86 a
Yodo 15 μM	14.06 b	2.675 b	74.79 b	1.23 c
Yodo 30 μM	14.03 b	2.713 b	76.82 b	1.25 c
Yodo 45 μM	14.55 b	2.790 b	78.61 b	1.28 c
Yodo 50 μM	13.02 c	2.073 d	55.59 d	1.52 b
R ²	0.8275	0.8486	0.9474	0.9492
C.V.	5.2535	5.5623	5.2077	5.4078
DMS	0.6627	0.2175	6.242	0.0992

Medias con diferente letra son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$). ALP: Altura de plántulas; DIAT: Diámetro de tallo de plántulas; AF: Área foliar total de plántulas; MS: Acumulación de materia seca en plántulas; R²: Coeficiente de determinación; C.V.: Coeficiente de variación; DMS: Diferencia mínima significativa ♦ Means with different letters are statistically different ($p \leq 0.05$). R²: Coefficient of determination; C.V.: Coefficient of variation; SMD: Significant minimum difference.

concentración de yodo en el medio de crecimiento ya que en concentración alta es tóxico (Caffagni *et al.*, 2011; Landini, *et al.*, 2011). La misma respuesta se encontró en cebolla (*Allium cepa* L.), zanahoria (*Daucus carota* L.), apio (*Apium graveolens* L.) y espinaca (*Spinacea oleracea* L.), al aplicar más de $5 \mu\text{M L}^{-1}$ de yodo, y con $40 \mu\text{M L}^{-1}$ o más las plantas fueron más pequeñas y con síntomas de toxicidad (Jiu *et al.*, 2004).

El diámetro de tallo aumentó hasta 32 % respecto al testigo con la aplicación foliar de $10 \mu\text{M L}^{-1}$ (Cuadro 1) y 20 % con $45 \mu\text{M L}^{-1}$. El tallo más delgado se presentó en las plántulas con la dosis más alta de yodo y con quemado en algunos bordes de las hojas.

El área foliar aumentó en las plántulas con aplicaciones de yodo en concentraciones medias (10 a $45 \mu\text{M L}^{-1}$) (Cuadro 1). La aplicación de $50 \mu\text{M L}^{-1}$ produjo plantas con hojas más pequeñas y algunos síntomas de toxicidad. La misma tendencia se reporta en la biofortificación de lechuga (*Lactuca sativa*) con siete concentraciones (10 , 20 , 30 , 40 , 80 , 160 , y $240 \mu\text{M L}^{-1}$ KI) y disminuyó el crecimiento de la planta y producción de biomasa al aplicar más de $20 \mu\text{M L}^{-1}$ de KI y la reducción es más notoria con $40 \mu\text{M L}^{-1}$ KI. El efecto tóxico del yodo en alta concentración está descrito para varias especies (Caffagni *et al.*, 2011; Landini, *et al.*, 2011; Zhu y Liu, 2003), pero no está bien entendido. Es probable que el exceso de yodo interfiera con el metabolismo y señalización celular de las ROS, causando respuestas negativas en el crecimiento y otros procesos.

La MS fue favorecida al aplicar a las hojas $10 \mu\text{M L}^{-1}$ de yodo; las plántulas testigo presentaron el peso seco más bajo (Cuadro 1) y con la dosis intermedias los valores fueron más bajos. Jiang *et al.* (2001) reportan resultados similares así como un efecto fitotóxico sobre el crecimiento de las plantas, y puede deberse a una acumulación excesiva del yodo en los tejidos vegetales, o que ya absorbido puede darse una oxidación intracelular a I_2 que inhibe el proceso fotosintético y se refleja en el desarrollo de la planta.

Índices de crecimiento

Andrews *et al.* (2001) y Raven *et al.* (2005) indican que los niveles de radiación, fotoperiodo, agua y nutrientes influyen en la acumulación de la MS y el área foliar, las cuales son factores determinantes en los índices de crecimiento. Y en las hojas se sintetizan los

(L.), and spinach (*Spinacea oleracea* L.); with iodine applications higher than $5 \mu\text{M L}^{-1}$, and with $40 \mu\text{M L}^{-1}$ or more, plants were smaller and with symptoms of toxicity (Jiu *et al.*, 2004).

Stem diameter increased up to 32 % with respect to the foliar application of $10 \mu\text{M L}^{-1}$ (Table 1), and 20 % with $45 \mu\text{M L}^{-1}$. The thinnest stem was observed in seedlings with the highest iodine doses, along with burns on some leaf edges.

The foliar area was maintained in seedlings with iodine applications of medium concentrations (10 to $45 \mu\text{M L}^{-1}$) (Table 1). The application of $50 \mu\text{M L}^{-1}$ produced plants with smaller leaves and some symptoms of toxicity. The same trend is reported in the biofortification of lettuce (*Lactuca sativa*) with seven concentrations (10 , 20 , 30 , 40 , 80 , 160 , and $240 \mu\text{M L}^{-1}$ KI), since there is a reduction in plant growth and biomass production with doses greater than $20 \mu\text{M L}^{-1}$ of KI, and reduction is most notorious with $40 \mu\text{M L}^{-1}$ KI. The toxic effect of iodine in high concentrations is described for various species (Caffagni *et al.*, 2011; Landini, *et al.*, 2011; Zhu and Liu, 2003), yet it is not properly understood. It is likely that the excess iodine interferes with the metabolism and cellular signaling of the ROS, causing negative responses on growth and other processes.

Dry matter was promoted when applying $10 \mu\text{M L}^{-1}$ of iodine on the leaves; the control seedlings showed the lowest dry weight (Table 1), and with intermediate doses, the values were lower. Jiang *et al.* (2001) report similar results, as well as a phytotoxic effect on plant growth, and it may be due to an excessive accumulation of iodine in the plant tissues, or that once absorbed, intracellular oxidation to I_2 can occur, producing an inhibition of the photosynthetic process, which reflects on the growth of the plant.

Growth indices

Andrews *et al.* (2001) and Raven *et al.* (2005) indicate that levels of radiation, photoperiod, water and nutrients have a direct influence on the accumulation of DM and foliar area, which are determining factors in growth indices. And in leaves carbohydrates are synthesized, which will be distributed to plant organs (Amaro *et al.*, 2004).

Applying iodine modified the dynamics of DM accumulation, changing the values of growth indices

carbohidratos que se distribuyen a los órganos de la planta (Amaro *et al.*, 2004).

La aplicación de yodo modificó la dinámica de la acumulación de MS, cambiando los valores de los índices de crecimiento (Cuadro 2). Los datos (Cuadro 1) señalan que el tratamiento de yodo 10 μM causó el mayor peso seco final, pero los datos en el Cuadro 2 indican que el comportamiento dinámico de la acumulación fue distinta en cada caso. Según estos resultados, la aplicación de yodo en diferentes concentraciones modificó la estrategia de reparto de la biomasa, su eficiencia de producción y como se utiliza para formar estructuras fotosintéticas.

Los valores de TAN en el Cuadro 2 indican para cada tratamiento el peso seco producido por unidad de área foliar. Los tratamientos de 10 y 15 μM produjeron menos biomasa por unidad de área foliar, pero tienen mayor área foliar (Cuadro 1) y acumularon más biomasa seca. Los tratamientos con yodo de 30, 45 y 50 μM fueron más efectivos que el testigo para acumular biomasa por unidad de área foliar y acumularon más MS que este último. Los cambios en TAN indican modificaciones morfológicas, fisiológicas y bioquímicas asociadas con el metabolismo del carbono (Shipley, 2002). En las plantas marinas el yodo ejerce un efecto significativo sobre el metabo-

(Table 2). Data (Table 1) indicate that the 10 μM iodine treatment displayed the highest dry weight, but data shown in Table 2 indicate that the dynamic behavior of the accumulation was different in each case. According to these results, iodine application in different concentrations modify the strategy of the biomass distribution, its production efficiency and how it is used to create photosynthetic structures.

The TAN values in Table 2 indicate, for each treatment, the dry weight produced per unit of foliar area. Treatments with 10 and 15 μM produced less biomass per unit of foliar area, but they have the highest foliar area (Table 1) and accumulated a greater amount of dry biomass. The iodine treatments with 30, 45, and 50 μM were more effective than the control for biomass accumulation per unit of foliar area, and they accumulated more dry weight than the control. Changes in TAN indicate morphological, physiological, and biochemical modifications related to carbon metabolism (Shipley, 2002). In marine plants, iodine has a significant effect on the photosynthetic metabolism (Kupper *et al.*, 2008), although we have no information available on this subject regarding terrestrial plants.

The results for TAC and TCR (Table 2) show a complex behavior towards iodine concentrations.

Cuadro 2. Índices de crecimiento en plántulas de pimiento morrón con aplicación foliar de seis dosis de KI.

Table 2. Growth indices in sweet pepper seedlings with six foliar applications of KI.

Aplicación foliar	TAN g cm ² d ⁻¹	TCA g d ⁻¹	TCR g g ⁻¹ d ⁻¹	AFE cm ² g ⁻¹
Testigo 0 μM	0.00011 d	0.0385 c	0.0101 a	32.037 b
Yodo 10 μM	0.00055 d	0.0378 c	0.0471 a	19.441 a
Yodo 15 μM	0.0359 c	0.0427 b	0.0424 f	19.111 c
Yodo 30 μM	0.0419 b	0.0603 a	0.0485 d	24.861 c
Yodo 45 μM	0.0514 a	0.0616 a	0.0086 e	25.178 c
Yodo 50 μM	0.00081 d	0.0182 d	0.0073 c	14.906 d
R ²	0.9991	0.9843	0.9988	0.9731
C. V.	3.0605	4.5303	2.4295	3.7328
DMS	0.0009	0.0026	0.0009	1.0337

Medias con diferente letra son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$); TAN: Tasa de asimilación neta; TCA: Tasa de crecimiento absoluto; TCR: Tasa de crecimiento relativo; AFE: Área foliar específica; R²: Coeficiente de determinación; C.V.: Coeficiente de variación; DMS: Diferencia mínima significativa ♦ Means with different letters are statistically different ($p \leq 0.05$); TAN: Net assimilation rate; TCA: Absolute growth rate; TCR: Relative growth rate; AFE: Specific leaf area; R²: Coefficient of determination; C.V.: Coefficient of variation; SMD: Significant minimum difference.

lismo fotosintético (Kupper *et al.*, 2008), pero no hay información sobre plantas terrestres.

Los resultados de TAC y TCR (Cuadro 2) muestran un comportamiento complejo para las concentraciones de yodo. Los valores altos de TCA en los tratamientos de 30 y 45 μM , que no tuvieron la mayor biomasa seca final (Cuadro 1), muestran que la plántulas no crecieron, sino que tuvieron una combinación de períodos de lento y rápido crecimiento, lo que pudiera indicar conflictos entre aporte y demanda. No obstante, presentaron mayor biomasa que el testigo. La TCR fue mayor para los tratamientos de 10, 15 y 30 μM , esto es, la mayor eficiencia en la acumulación de biomasa fue con las concentraciones intermedias de yodo.

Los datos del AFE (Cuadro 2) señalan los cambios inducidos por la concentración de yodo en la estrategia de la planta para repartir la biomasa seca. El AFE es un indicador de cómo la planta acumula biomasa seca en las estructuras foliares. Los valores bajos del AFE en los tratamientos de 10 y 15 μM muestran que las plantas tuvieron una alta densidad de estructuras fotosintéticas, cuya evidencia es la gran cantidad de masa por unidad de área foliar, comparado con el testigo y con las aplicaciones de 30 y 45 μM KI. Potencialmente esta característica se asociaría con mayor eficiencia de absorción de radiación PAR por unidad de área foliar. (Yao *et al.*, 2016).

Es difícil explicar con mayor amplitud los resultados anteriores sin tener más información bioquímica, anatómica y genómico. Pero, los resultados muestran una dirección para investigaciones acerca del efecto del yodo en las plantas de cultivo.

Actividad antioxidante total

Las aplicaciones de yodo, como yoduro de potasio, aumentan la capacidad antioxidante de los tejidos de las plantas. En la Figura 1 se muestra como todas las concentraciones de KI aplicadas aumentaron hasta 12 % la inhibición del DPPH, incluso con las dosis más altas de KI, las cuales redujeron la altura de las plantas algunos síntomas de toxicidad. Esta respuesta es similar a la observada en hojas de lechugas tratadas con dosis de KI menores a 40 μM (Leyva *et al.*, 2011). En otro experimento con lechugas, aplicaciones de 10 a 40 μM causaron un claro incremento en la actividad antioxidante total, debido principalmente a un aumento en los niveles de ácido

The high TCA values in treatments with 30 and 45 μM , which did not have the highest final dry biomass (Table 1), show that seedlings did not grow uniformly, but rather had a combination of slow and rapid growth periods, which could identify conflicts between supply and demand. Nevertheless, they presented a greater biomass than the control. TCR was highest for treatments with 10, 15, and 30 μM , indicating that the highest efficiency in biomass accumulation took place with the intermediate iodine concentrations.

The data for AFE (Table 2) indicate the changes induced by the concentration of iodine in the strategy of the plant to distribute the dry biomass. AFE is an indicator of how the plant accumulates dry biomass in the foliar structures. The low AFE values in treatments with 10 and 15 μM show that plants had a high density of photosynthetic structures, evident due to the large amount of mass per unit of foliar area, as compared to control and the application of 30 and 45 μM KI. Potentially, this characteristic would relate to a higher efficiency of radiation absorption PAR per unit of foliar area. (Yao *et al.*, 2016).

It is difficult to explain the above results in depth without more biochemical, anatomic, and genomic information. However, the results show a direction for research about the effect of iodine on crop plants.

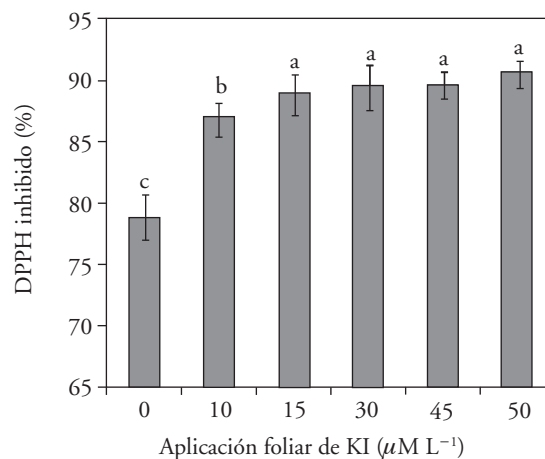


Figura 1. Actividad antioxidante en plántulas de pimiento morrón con aplicación foliar de seis dosis de KI.
Figure 1. Antioxidant activity in sweet pepper seedlings with foliar application of six KI doses.

ascórbico en su forma reducida y esta molécula tiene una capacidad alta para donar electrones y neutralizar directamente radicales libres en reacciones enzimáticas y no enzimáticas (Blasco, 2010). La respuesta antioxidante obtenida con estos tratamientos es relevante porque eleva la tolerancia de las plantas ante condiciones de estrés (Stevens *et al.*, 2008).

Contenido de yodo y minerales en la parte aérea de las plántulas

La concentración de yodo en las plántulas de pimiento morrón fue directamente proporcional a la dosis aplicada vía foliar (Figura 2). Hubo un aumento notable en la concentración de yodo en el tratamiento de $45 \mu\text{M L}^{-1}$ y de tres veces más con $50 \mu\text{M L}^{-1}$ respecto a los otros tratamientos.

Los resultados de nuestro estudio muestran como la absorción de yodo por las plántulas de pimiento morrón es directamente proporcional con las concentraciones aplicadas y hay una tendencia similar entre la concentración de yodo en parte aérea y antioxidantes totales. Estos resultados son similares a los reportados por Ujowundu *et al.* (2010) al biofortificar con yodo especies de hortalizas nativas de Nigeria, y hubo una mayor concentración de yodo en los tejidos vegetales al aumentar las dosis de yoduro y yodato de potasio en sus tratamientos.

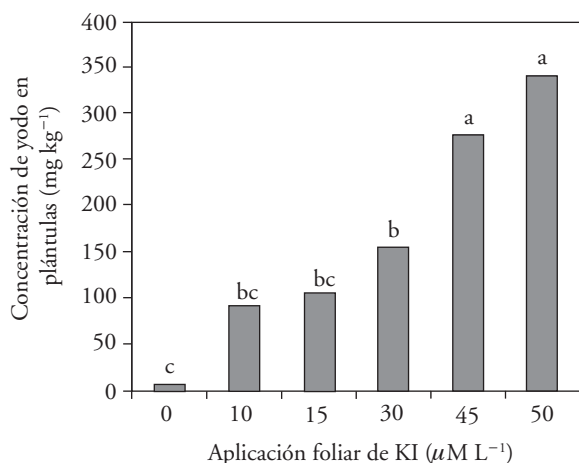


Figura 2. Concentración de yodo en tejido vegetal de plántulas de pimiento morrón con aplicación foliar de seis dosis de KI.

Figure 2. Concentration of iodine in sweet pepper seedlings tissues with foliar application of six KI doses.

Total antioxidant activity

Iodine applications, as potassium iodide, increase antioxidant capacity of plants tissues. In Figure 1 it is shown that all KI concentrations increased up to 12 % DPPH inhibition, even with the highest KI concentrations, which caused reductions in plants height as well as some toxicity symptoms. This finding is similar to that observed in lettuce leaves treated with KI doses lower than $40 \mu\text{M}$ (Leyva *et al.*, 2011). In another experiment with lettuce, 10 to $40 \mu\text{M}$ does caused a clear increment of total antioxidant activity, mainly due to an increase in levels of ascorbic acid, in its reduced form, and this molecule has a high capacity to donate electrons and directly neutralize free radicals in enzymatic and non enzymatic reactions (Blasco, 2010). The antioxidant response obtained with these treatments is relevant because it increases plants tolerance to stress conditions (Stevens *et al.*, 2008).

Content of iodine and minerals in the aerial section of seedlings

The concentration of iodine in sweet pepper seedlings was directly proportional to the foliar dose applied (Figure 2). There was a considerable increase in iodine concentration in treatment with $45 \mu\text{M L}^{-1}$, and threefold with $50 \mu\text{M L}^{-1}$ with regard to the treatments.

The results of our study show that iodine absorption by sweet pepper seedlings is directly proportional to the concentrations applied and there is a similar trend for iodine in the aerial section and total antioxidants. These results are similar to those reported by Ujowundu *et al.* (2010) who biofortified different species of vegetables, native to Nigeria, with iodine and there was a higher concentration of iodine in plant tissues when the doses of potassium iodate or iodide increased in their treatments.

Jiu *et al.* (2006) point out that iodine concentration increases in leaves and roots of spinach when increasing the doses of potassium iodate and iodide. Besides, Zhu *et al.* (2003) report that the accumulation of iodine in foliar tissue of spinach is directly proportional to doses of iodine supplied.

For the nutritional concentration of the aerial section, results show that the application of iodine increased nitrogen concentration by an average of

Jiu *et al.* (2006) señalan que la concentración de yodo aumenta en las hojas y en la raíz en espinaca al aumentar las dosis de yoduro y yodato de potasio. Además, Zhu *et al.* (2003) reportan que la acumulación de yodo en tejido foliar de espinaca es directamente proporcional a las dosis de yoduro.

En la parte aérea, los resultados muestran que la aplicación de yodo incrementó en 5 % la concentración de nitrógeno, excepto con 45 $\mu\text{M L}^{-1}$ la cual redujo el contenido de N, posiblemente por efecto de toxicidad (Figura 3).

La concentración más baja de P, K, Ca, Mg, S se presentó en las plantas testigo, pero las dosis bajas y medias de yodo incrementan las concentraciones de los macro y minerales (Cuadro 3). Blasco *et al.* (2011) indican que la aplicación de yodo en la lechuga a dosis no mayores de 40 $\mu\text{M L}^{-1}$, favorece la calidad nutricional, sin un efecto fitotóxico, por lo que consideran al yodo como un elemento beneficioso para las plantas y puede utilizarse en esas dosis. Jiu *et al.* (2004), al estudiar el efecto residual de yodo en el suelo, mencionan que concentraciones bajas de este elemento promueve la absorción y aprovechamiento de elementos esenciales en varias especies de plantas.

Los resultados (Cuadro 2) indican que una dosis óptima de aplicación foliar de yodo está entre 10 a 15 $\mu\text{M L}^{-1}$, ya que favorece la absorción de los minerales. Además el incremento de área foliar por aplicación de yodo, muestra que el yodo favorece el desarrollo y absorción de minerales en plántulas de pimiento morrón.

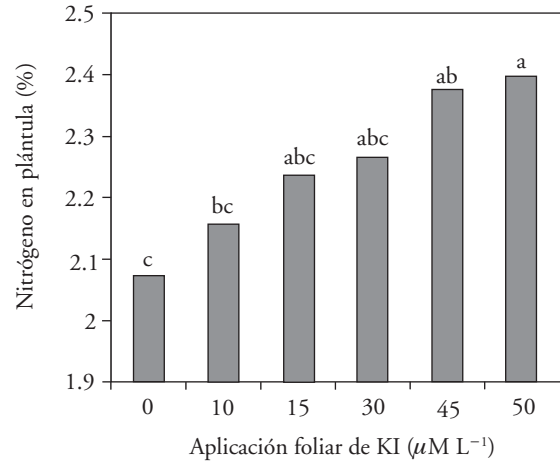


Figura 3. Concentración de nitrógeno total en tejido vegetal de plántulas de pimiento morrón con aplicación foliar de seis dosis de KI.

Figure 3. Concentration of total nitrogen in sweet pepper seedlings tissues with foliar application of six KI doses.

5 %, except with 45 $\mu\text{M L}^{-1}$, which reduced the amount of N, possible due to the effect of toxicity (Figure 3).

The lowest concentration of P, K, Ca, Mg, and S (Cuadro 3), was found in control plants. This chart shows that applying iodine in low and medium doses increase the concentrations of the elements quantified. Blasco *et al.* (2011) indicate that applying iodine on lettuce in doses of no more than 40 μM

Cuadro 3. Concentración de minerales en parte aérea de plántulas de pimiento morrón con aplicación foliar de seis dosis de KI.

Table 3. Minerals concentrations in aerial parts of sweet pepper seedlings with six foliar applications of KI.

Aplicación foliar	P	K	Ca mg kg ⁻¹	Mg	S
Testigo 0 $\mu\text{M L}^{-1}$	517 a	3593 a	5715 b	5874	1860
10 $\mu\text{M L}^{-1}$	1288 a	4371 a	12973 ab	9648	2347
15 $\mu\text{M L}^{-1}$	1163 a	4599 a	16599 a	9525	2210
30 $\mu\text{M L}^{-1}$	1134 a	4072 a	12630	8882	2101
45 $\mu\text{M L}^{-1}$	990 a	4473 a	12184	8549	2085
50 $\mu\text{M L}^{-1}$	846 a	3902 a	12030	8005	1897
R ²	0.4932	0.1426	0.6358	0.3890	0.6227
C.V.	20.053	11.6432	19.8691	13.870	15.541
LSD	484.14	1199.9	6507.20	2952.5	747.48

CONCLUSIONES

La aplicación foliar de yodo, como KI, en plántulas de pimiento morrón mejora la absorción de minerales, la cantidad y actividad de antioxidantes y el vigor de la plántula. Por lo tanto, la inclusión de yodo en la producción de almárgos permite obtener material vegetal de mejor calidad al trasplante.

LITERATURA CITADA

- Amaro J. A., E. L. García y J. F. Henríquez. 2004. Análisis del crecimiento, área foliar específica y concentración de nitrógeno en hojas del pasto "mulato" (*Brachiaria hibrido*, cv.). Tec. Pecu. Mex. 42: 447-458.
- Andrews M., J. A. Raven, and J. I. Sprent. 2001. Environmental effects on dry matter partitioning between shoot and root of crop plants: relations with growth and shoot protein concentration. Ann. Appl. Biol. 138: 57-68.
- Blasco B. 2010. Biofortificación con yodo en plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L.). implicaciones fisiológicas y nutricionales. Universidad de Granada. España. pp: 70-75.
- Blasco B., J. Ríos J., L. Cervilla M., Sánchez-Rodríguez E., J. Ruiz M., and Romero L. 2008. Iodine biofortification and antioxidant capacity of lettuce: potential benefits for cultivation and human health. Ann. Appl. Biol. 152: 289-299.
- Blasco B., J. Ríos J., Leyva R., L. Cervilla M., Sánchez, R. E., Rubio-Wilhelmi, Rosales M. M., M. Ruiz, and J. M. Romero. 2011. Does iodine biofortification affect oxidative metabolism in lettuce plants? Biol. Trace Elem. Res 142: 831-842.
- Bremner J. M. 1965. Total nitrogen. Agronomy 9: 1149-1178.
- Caffagni, A., Arru, L., Meriggi, P., Milc, J., Perata, P. & Pecchioni, N. 2011. Iodine fortification plant screening process and accumulation in tomato fruits and potato tubers. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 42: 706-718.
- Fisher P. W. F., L. Abbe M. R, and Giroux A. 1986. Colorimetric determination of total iodine in foods by iodide-catalyzed reduction of Ce⁺⁴. J. Assoc. Official Anal. Chem. 69: 687-689.
- Gupta, N., Bajpai, M., Majumdar, R. & Mishra, P. 2015. Response of iodine on antioxidant levels of *Glycine max* L. grown under Cd²⁺ stress. Advan. Biol. Res. 1: 40-48.
- Jiang X. M., X. Y. Cao, and J. Y. Jiang, 2001. Four-year experience in iodination of irrigation water in Hotien, Xinjiang province of China, Arch. Environ. Health 152: 399-408.
- Jiu-Lan D., Z. Yong Guan, Min-Zhang, and Yi-Zhong H. 2004. Iodine-enriched selecting vegetables and the residual effect of iodate application to soil. Research Center for Eco-environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China; and College of Environment and Resource, Shandong Agricultural University, Tailan 271018, China.
- Jiu-Lan D., Z. Yong-Guan, Min-Zhang, and Yi-Zhong H. 2006. Availability of iodide and iodate to spinach (*Spinacia oleracea* L.) in relation to the total iodine in soil solution. Plant Soil 289: 301-308.
- Kabata-Pendias, A. 2011. Trace Elements in Soils and Plants (4th ed.) CRC Press, Taylor and Francis Group. New York. pp: 397-401.

L⁻¹ promotes nutritional quality without phytotoxic effects, and therefore iodine is considered a beneficial element for plants and can be used in these doses. Jiu *et al.* (2004), in a study of the effect of residual iodine in the soil, mentions that low concentrations of this element promote absorption and the use of essential elements in an important number of plant species.

Results (Table 2) indicate that there is an optimum dose of iodine application on leaves, of 10 to 15 $\mu\text{M L}^{-1}$, since it promotes nutrient absorption. Besides, the results on the increase of foliar area by iodine absorption show that iodine promotes growth and minerals absorption in sweet pepper seedlings.

CONCLUSIONS

Foliar application of iodine as KI, on leaves of sweet pepper seedlings, improves minerals absorption, the amount and activity of antioxidants, as well as vigor of seedlings. Therefore addition of iodine in the production of seedbeds allows to obtain plant material of a higher quality in grafting.

—End of the English version—



- Kanshe, F. 1999. Iodine deficiency disorders: In: encyclopedia of human nutrition. Academic Press. London. pp: 1136-1153.
- Kupper, F. C., Carpenter, L., Mcfiggans, G., Palmere, G., Waithe, T., Boneberg, E., Woitsch, S., Weiller, M., Abela, R., Grolimund, D., Potin, P., Butler, A., Luther, G., Kroneck, P., Meyer-Klaucke, W. & Feiters, M.C. 2008. Iodide accumulation provides kelp with an inorganic antioxidant impacting atmospheric chemistry. PNAS. 105: 6954-6958.
- La Barre, S., Potin, P., Le blanc, C. & Delage, L. 2010. The halogenated metabolism of brown algae (Phaeophyta), its biological importance and its environmental significance. Mar. Drugs. 8: 988-1010.
- Landini M., Gonzali S., and Perata P. 2011. Iodine biofortification in tomato. J. Plant Nutr. Soil Sci 174: 480-486.
- Leyva, R., Sánchez-Rodríguez E., Ríos J., Rubio-Wilhelmi M., Romero L., Ruiz J. M., and Blasco B. 2011. Beneficial effects of exogenous iodine in lettuce plants subjected to salinity stress. Plant Sci. 181: 195-202.
- Melgarejo M. L., Barrera J., y Suárez D. 2011. Experimentos en fisiología vegetal. Laboratorio de fisiología y bioquímica vegetal. Departamento de Biología. Universidad Nacional de Colombia.
- Raven J. A., M. Andrews., and A. Quigg. 2005. The Evolution of Oligotrophy: Implications for the breeding of crop plants

- for low input agricultural systems. *Ann. Appl. Biol.* 146: 261-280.
- Scherer R., and G. H. Teixeira 2009. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chem.* 112: 654-658.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera 2010. Un Panorama del cultivo del Chile. Consultado 09/2016. <http://infosiap.siap.gob.mx/images/stories/infogramas/100705-monografia-chile.pdf>
- Shipley, B., 2002. Trade-offs between net assimilation rate and specific leaf area in determining relative growth rate: relationship with daily irradiance. *Functional Ecology*, 16(5): 682-689.
- Stevens R., Page D., Gouble B., Garchery C., Zarmir D., Causse M. 2008. Tomato fruit ascorbic acid content is linked with monodehydroascorbate reductase activity and tolerance to chilling stress. *Plant Cell Environ.* 31: 1086-1096.
- Ujowundu C. O., Ukoha A. I., Agha C. N., Nwachukwu N., Igwe K. O. and Kalu F. N. 2010. Effects of potassium iodate application on the biomass and iodine concentration of selected indigenous Nigerian vegetables. *Afr. J. Biotech.* 9: 7141-7147.
- Venturi, S. 2011. Evolutionary significance of iodine. *Current Chem. Biol.* 5: 155-168.
- Yao, H., Zhang, Y., Yi, X., Zhang, X. and Zhang, W., 2016. Cotton responds to different plant population densities by adjusting specific leaf area to optimize canopy photosynthetic use efficiency of light and nitrogen. *Field Crops Research*, 188: 10-16.
- Zhu, Y. G., Huang, Y. Z., Hu Y., Liu Y. X. 2003. Iodine uptake by spinach (*Spinacia oleracea* L.) plants grown in solution culture: Effects of iodine species and solution concentrations. *Environ. Int.* 29: 33-37.