

Estudio comparativo de la tolerancia al boro de dos variedades de pimiento (*Capsicum annuum* L.)

Comparative study of boron tolerance of two varieties of pepper (*Capsicum annuum* L.)

María Jesús RODRÍGUEZ GUERREIRO ¹, Eugenio MUÑOZ CAMACHO¹ y María de los Ángeles BERNAL PITA DA VEIGA²

¹Departamento de Ingeniería Industrial II, Escuela Politécnica Superior, C/ Mendizábal s/n Ferrol, 15403 y

²Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal y Ecología, Campus Zapateira s/n, 15071. Universidad de A Coruña. E-mails: chus@cdf.udc.es, emucam@cdf.udc.es y bernal.@udc.es  Autor para correspondencia

Recibido: 05/03/2009

Primera revisión recibida: 24/09/2009

Fin de primer arbitraje: 07/05/2009

Aceptado: 23/12/2009

RESUMEN

Con el objetivo de ampliar los conocimientos sobre el uso de cultivos tolerantes que puedan ser aplicados en zonas donde exista riesgo de toxicidad por boro, se estudió la respuesta de dos variedades de pimiento (pimiento de Padrón y pimiento Luesia), utilizando dos tratamientos de Boro (B) en el agua de riego: 0,5 y 5 ppm, durante un período de cuatro semanas. Se procedió, a cultivar el pimiento en sustrato (perlita), realizándose el análisis de la producción de biomasa y el análisis de boro en los distintos órganos de la planta, según el método espectrofotométrico de la azometina-H. Se concluye que ante los mismos aportes de boro, la respuesta de las dos variedades en cuanto a contenido de boro en planta y a producción de biomasa, es diferente, señalando al pimiento de Padrón como la variedad más tolerante al boro.

Palabras Clave: Pimiento de Padrón, Pimiento Luesia, toxicidad, boro, azometina-H.

ABSTRACT

The aim of this paper is to become more knowledgeable about which crops are more tolerant to boron and therefore can be cultivated in areas where there is a risk of boron toxicity. The response of two varieties of pepper (Padrón and Luesia) was studied using two boron (B) treatments in the irrigation water: 0.5 and 5 ppm, over a four-week period. To this end, the pepper were cultivated in perlite and two analyses were carried out. One was related to the production of biomass. The other, which entailed a study of the boron in specific organs of the plant by means of the azomethine-H spectrophotometric method. In conclusion, it may be asserted that, with the same levels of boron, the behaviour of the two varieties of pepper was different in terms of boron content in the plants and biomass production, indicating that the Padron variety of pepper is more tolerant to boron.

Kew Words: Padron pepper, Luesia pepper, toxicity, boron, azomethine-H.

INTRODUCCIÓN

La producción de pimiento en Galicia se encuentra entre una de las más destacadas de los cultivos hortícolas, habiendo llegado en la década actual, hasta las 22.900 ha de superficie dedicada a este cultivo y a 1.000.000 de toneladas de producción anual (Anuario de Estadística Agraria, 2006). Las dos especies objeto de estudio, pimiento de Padrón y pimiento Luesia, son variedades de la especie *Capsicum annuum* L., siendo el pimiento de Padrón, el más apreciado por los consumidores gallegos.

Es importante señalar el efecto favorable del boro sobre el crecimiento de las plantas (Goldbach y

Wimmer, 2007; Fujiwara y Matoh, 2009), siendo una práctica habitual el incorporar boro como fertilizante para incrementar la producción de los cultivos (El-Maksoud *et al.*, 1974; Gupta, 1979; Brown, 1998a; Brown, 1998b; Nyomora *et al.*, 2000; Christensen *et al.*, 2006 y Wang *et al.*, 2007). Los requerimientos de B entre especies son altamente variables ya que la cantidad óptima para una especie puede ser tóxica o insuficiente para otra (Papadakis *et al.*, 2004; Rodríguez *et al.*, 2005, Camacho-Cristóbal *et al.*, 2008). Los conocimientos actuales sobre la toxicidad de B son bastante limitados y son muchos los campos objeto de estudio que quedan por analizar, entre ellos cabe destacar el conocimiento del uso de cultivos

tolerantes que puedan ser aplicados en zonas donde exista riesgo de toxicidad por boro.

En general, la toxicidad de B en las plantas es debida, por una parte, a la calidad del agua de riego utilizada (Muñoz *et al.*, 1999) y por otra al exceso de B contenido en los suelos. Estos suelos, serían aquellos que proceden de sedimentos marinos (Bradford, 1966); de regiones áridas o semi-áridas (Ryan *et al.*, 1998), donde la falta de lluvia provoca poca lixiviación; derivados de depósitos geológicamente jóvenes y en general, los derivados de materiales ricos en boro. En ríos de Sudamérica, por ejemplo, se han encontrado contenidos de boro entre 4 y 26 mg L⁻¹ como resultado de los altos niveles de este mineral en el suelo (Smallwood, 1998). Una importante fuente industrial que proporciona altas concentraciones de boro en el suelo, son los productos procedentes de la combustión del carbón (CCB) (Aiteken *et al.*, 1984). Estos se mezclan con residuos sólidos orgánicos procedentes de los lodos de las aguas residuales urbanas y se utilizan para la fabricación de compost, encontrando evidencias de los efectos adversos de los CCB en las propiedades de los suelos y en el desarrollo de las plantas (Guest *et al.*, 2001). Por ello, es importante controlar su uso y utilizarlo exclusivamente cuando el suelo contenga cantidades lo suficientemente bajas en boro, cuando exista una alta tasa de lixiviación o cuando trabajemos con cultivos tolerantes para no causar toxicidad.

Por otra parte, el B es un constituyente de todas las aguas naturales en cantidades que varían desde contenidos traza a algunas partes por millón (ppm), lo que hace que el agua de riego, sea uno de los factores más importantes a tener en cuenta, a la hora de establecer criterios de sensibilidad de boro en diferentes cultivos. En general, se considera que las aguas de riego con contenidos de B superiores a 4 ppm son inadecuadas para las plantas (Candela y Masich, 1984) y en particular, concentraciones superiores a 2 ppm de B en el agua de riego son inapropiadas para el cultivo de pimiento (LAN 2007/472. O del 10/10/07).

La tolerancia al B de las distintas especies de plantas, clasificándose como sensibles, semitolerantes y tolerantes (Wilcox, 1960), está en función de la velocidad de acumulación del microelemento y no en la resistencia de los distintos tejidos a la toxicidad, así, las plantas tolerantes acumulan B a una velocidad muy baja mientras que las plantas sensibles lo hacen

muy rápidamente. Estudios de variaciones genéticas con respecto a los síntomas de toxicidad de B, han identificado las regiones cromosómicas implicadas en dichos síntomas (Yau *et al.*, 1997 y Yau, 2002). El pimiento se clasifica como una planta semitolerante en cuanto a la toxicidad del elemento B (Mello *et al.*, 2002). De los estudios actuales sobre la fisiología de la tolerancia del B en las plantas, puede afirmarse que no existe un mecanismo que active un flujo de salida de B y que modifique la permeabilidad de la membrana, para poder prevenir la acumulación de concentraciones tóxicas dentro de las células (Stangoulis *et al.*, 2001), de ahí la importancia de profundizar en el conocimiento del uso de cultivos tolerantes que puedan ser aplicados en zonas donde exista riesgo de toxicidad por B.

El método de la azometina H, es el método espectrofotométrico más comúnmente utilizado para la determinación de B en tejidos de plantas desde su desarrollo en los años 60 (Shanina *et al.*, 1967) hasta nuestros días, especialmente debido a su amplia sensibilidad, desplazando por ello, a reactivos como la curcumina (Aznárez y Mir, 1984), quinalizarina (Willis, 1970) ó 1,1'-diantrimida (Gorfinkiel y Pollard, 1952), consiguiendo ser el método alternativo a los elevados costes de los métodos más sensibles de ICP. Muchos han sido los autores que han aportado sucesivas modificaciones, con el objetivo de mejorar y avanzar hacia resultados más sensibles y selectivos (Zenki, 1994; De Acevedo *et al.*, 1998; Zajun *et al.*, 1999), precisos y rápidos (Wolf, 1974; Lachica, 1976; Krug *et al.*, 1981; Porter *et al.*, 1981; Carrero *et al.*, 1993; Nogueira *et al.*, 1993) y libres de interferencias (Ferran *et al.*, 1988).

El objetivo de este trabajo fue comparar la respuesta de dos variedades de pimiento (*Capsicum annuum* L.), con dos tratamientos de B en el agua de riego (0,5 y 5 ppm de B), atendiendo a criterios de toxicidad, para valorar posibles diferencias en cuanto a la tolerancia al B.

MATERIAL Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en el Laboratorio de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias de la Universidad de A Coruña en España, cuyas coordenadas geográficas son 43° 19' 35,15" N y 8° 24' 35,14" O y una altitud de 135 m.

Tratamiento de las semillas y cultivo

Se sembraron semillas de pimiento de Padrón y pimiento Luesia en el invernadero de la Facultad de Ciencias de A Coruña, en la primavera de 2006, las cuales procedían de la Agencia de Extensión Agraria de Padrón (A Coruña) guardadas en bolsas de papel en la oscuridad y sin humedad. Las semillas una vez desinfectadas, se mantuvieron en agua durante 24 horas para posteriormente sembrarlas usando como sustrato una mezcla de tierra vegetal y de perlita en una proporción 3:1. Estas bandejas se colocaron en la cámara de cultivo bajo condiciones controladas de un ciclo de 16 horas de luz, 8 de oscuridad, 70 % de humedad relativa y una temperatura controlada 25°/18° C día/noche. Al cabo de 8-12 días las plántulas emergieron del sustrato y se mantuvieron en bandejas durante 2 meses. Cuando las plantas alcanzaron 20 cm fueron transplantadas a macetas grandes de plástico con reservorio para el agua de riego, con un volumen de 27 dm³ y se trasladaron al invernadero donde se cultivaron en sustrato (perlita) con solución nutritiva, cuya composición en macronutrientes (mM) era: 4 NO₃K; 3 Ca(NO₃)₂; 2 KH₂PO₄; 1 MgSO₄ y 0.1 NaCl y en micronutrientes (ppm): 2.0 Fe(NH₄)₂(SO₄)₂ · 6H₂O; 1.0 MnSO₄ · H₂O ; 0.5 CuSO₄ · 5H₂O; 0.5 ZnSO₄ · H₂O; 0.1 H₂MoO₄. Se ajustó el pH final de la solución cada vez que se aplicaba el riego de plantas a 6.0 – 6.5.

Diseño experimental

El diseño experimental utilizado fue el cultivo de 48 plantas de pimientos, repartidas en 6 macetas, con 8 plantas (estado juvenil) cada una, tres macetas para pimiento de Padrón y tres macetas para pimiento Luesia sometidas todas ellas a 2 tratamientos (0,5 ppm y 5 ppm de B) excepto dos macetas, una de cada variedad que actuarán como testigo. Se utilizaron las variables de respuesta: contenido de boro en los distintos órganos de la planta y producción de biomasa.

Aplicación del Boro

Al cabo de 30 días en el invernadero, se procedió al aporte de dos niveles de B: 1) 0,5 ppm y 2) 5 ppm. Los tratamientos se aplicaron durante 4 semanas. Tras la primera semana se extrajeron dos plantas de cada maceta para su análisis, siguiendo el mismo procedimiento en la 2^a, 3^a y 4^a semana. Los riegos se aplicaron con solución nutritiva una vez a la semana, aportando un volumen de 2 litros en el

reservorio de cada maceta. Cada dos días se rellenaban los niveles de las macetas con agua destilada.

Determinación del Boro

Mediante el método Espectrofotométrico de la azometina-H (Lachica, 1976), se determinó el contenido de B realizando previamente la digestión del material vegetal. Para ello, se procedió al cortado y secado de las distintas partes de las plantas, hasta peso constante a una temperatura de 60° C. Para la extracción vegetal se pesaron 2g del material vegetal seco y molido en una cápsula de porcelana, la cual se depositó en un horno mufla frío. Se calentó hasta 450° C durante 2 horas manteniendo esa temperatura otras 2 horas más. Se dejó enfriar. Posteriormente se humedecieron las cenizas con 2-3 mL de agua y 1 mL de HCl concentrado añadido lentamente, y se calentó sobre placa caliente hasta que aparecieron los primeros vapores. Se filtró sobre papel de filtro lavado previamente con HCl 1:1 caliente, y luego con agua hasta que se eliminaron los restos de HCl, recogiendo el filtrado sobre un matraz aforado de 100 mL. Se incineró el papel de filtro con su contenido durante media hora a 550° C, utilizando la misma cápsula. Se dejó enfriar y se agregaron 5 mL de HF. Se llevó a sequedad, suavemente sobre placa caliente sin pasar de 250° C. Se filtró sobre el mismo matraz de 100 mL y se enrasó con agua, una vez fría la solución.

Se realizó una curva de calibrado de B en el rango de 0 – 1,6 mg L⁻¹. Para la preparación de la muestra, se introdujo en tubos de tamaño de 15 x 150 mm, 5 mL de la muestra (extracción vegetal), 4 mL de disolución tampón-enmascarante (acetato de amonio, sal tetrasódica del Ácido etilendiaminotetracético, sal disódica del ácido nitriloacético y ácido acético concentrado. pH 5,49) y 2 mL de la disolución de azometina. Se midió en el espectrofotómetro visible-ultravioleta a una longitud de onda de 410 nm, la absorbancia de cada uno de los patrones de la curva de calibrado y de la muestra frente al blanco, hora y media después de haber agregado el reactivo de azometina-H. La obtención de las concentraciones de boro expresadas en ppm por peso seco de material vegetal se calcularon mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{ppm}}{\text{DW}} = \frac{\text{ppmB} \times \text{Vfinal}}{\text{Vmedida} \times \text{DW final}} \times \text{DWmedida}$$

El análisis de la producción de biomasa se realizó en términos de evolución de peso fresco y peso seco total, durante el período de tratamiento de B de las dos variedades de pimiento.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Mediante el método de la azometina-H, se midió boro en los diferentes órganos de las plantas de pimiento de Luesia y Padrón, cuatro semanas después de iniciado el tratamiento. Los valores representan la media y la desviación típica de dos digestiones y n=3.

En términos generales, la cantidad de boro adecuada y no excesiva de este elemento en planta es de 20-100 ppm (André Loué, 1988). Estos valores coinciden con los ofrecidos por la Comunidad de Andalucía que es la única que legisla los contenidos adecuados de boro en las hojas de las plantas del pimiento cultivadas bajo abrigo con valores entre 20-60 ppm de B (LAN 2007/472). Las plantas objeto de

estudio de pimiento Luesia tratadas con 5 ppm de B en el agua de riego, presentaron valores de boro en las hojas en ese intervalo con un valor máximo en hoja del orden de 80 ppm 3 semanas después de iniciado el tratamiento, mientras que para ese mismo aporte de B externo, el pimiento de Padrón mostró niveles 10 veces inferiores, 2 semanas después. Los tallos y raíces de ambas variedades de pimiento no presentan niveles importantes de B (Figuras 1 y 2, Cuadros 1, 2, 3 y 4).

Tanto en tomate como en patata valores inferiores a 10 ppm de B en hoja, indicarían síntomas claros de deficiencia. Si consideramos que el pimiento pertenece a la familia *Solanaceae*, los resultados obtenidos nos permiten afirmar que las plantas de pimiento de Luesia presentan un aporte adecuado de B cuando utilizamos 5 ppm, aporte claramente deficiente en el caso del pimiento de Padrón. Este aporte se traduce en un incremento progresivo del peso fresco y peso seco y unos niveles de B en hoja dentro del rango adecuado.

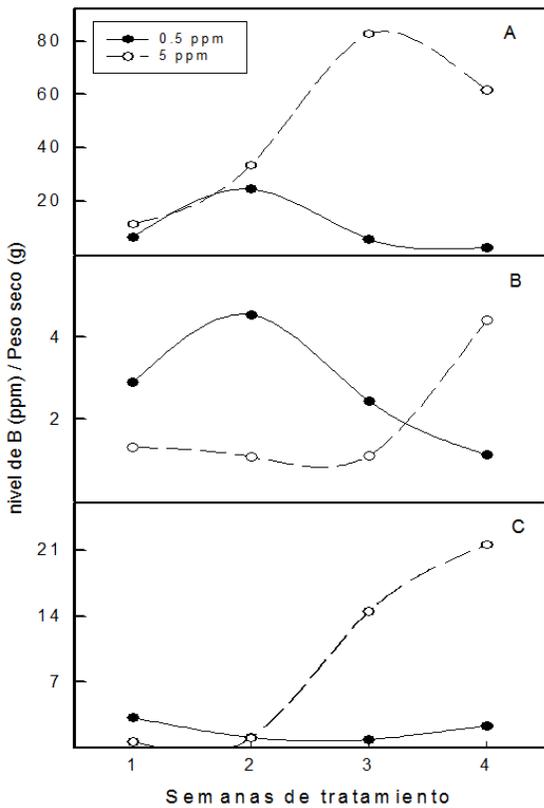


Figura 1. Determinación de B en hoja (A), tallo (B) y raíces (C) a lo largo de 4 semanas de tratamiento en pimiento Luesia.

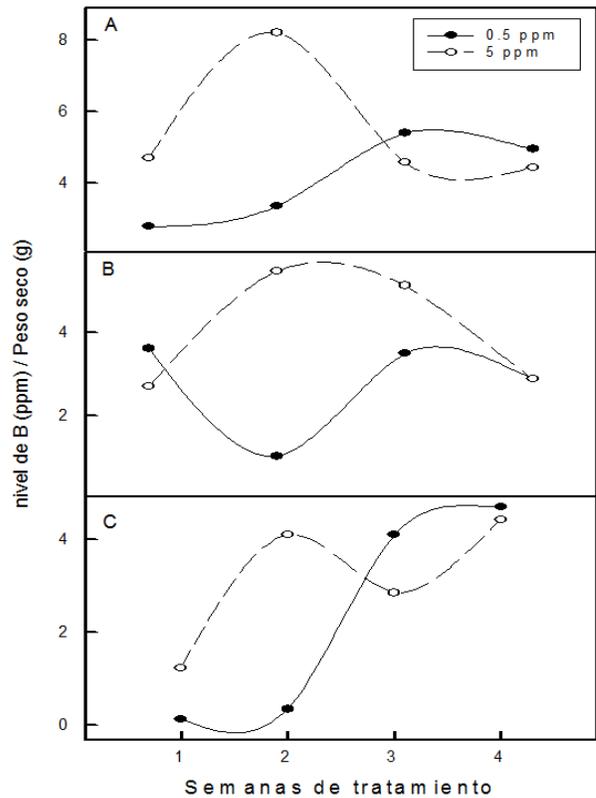


Figura 2. Determinación de B en hoja (A), tallo (B) y raíces (C) a lo largo de 4 semanas de tratamiento en pimiento de Padrón

Cuando se analizó la producción de biomasa (Figuras 3 y 4), en términos de evolución del peso fresco y peso seco total después de cuatro semanas de tratamiento, se encontró que ante los mismos aportes de B, el comportamiento de las dos variedades de pimiento fue diferente. En el caso de las plantas de pimiento Luesia, éstas se caracterizan por presentar una respuesta positiva al aumento en el aporte de B. De esta manera, a medida que avanza el tratamiento, se observa un incremento en ambas variables.

Si bien el peso seco parece una variable adecuada a valorar en las plantas de Luesia, en

plantas de pimiento de Padrón no aparecen diferencias significativas entre estas dos variables, lo cual nos induce a pensar que probablemente estemos trabajando con niveles subóptimos de B para producir toxicidad en el pimiento de Padrón.

Dado que el contenido adecuado y legislado de boro en el agua de riego para pimiento es de 2 ppm, y en el presente estudio, aportando 5 ppm en el agua de riego no se encontraron síntomas de toxicidad en planta, sería necesario continuar con las investigaciones acerca de la tolerancia de B a la toxicidad para ambas variedades de pimiento.

Cuadro 1. Contenido de boro en pimiento Luesia con la aplicación de 0,5 ppm de boro.

Semanas de tratamiento con boro (0,5 ppm)	Pimiento Luesia					
	Hoja		Tallo		Raíz	
	Media	D. Típica	Media	D. Típica	Media	D. Típica
1	6,4814	0,136	2,9015	0,034	3,2568	0,045
2	24,527	0,098	45583	0,056	1,1394	0,012
3	5,6512	0,065	2,4445	0,023	0,9108	0,025
4	2,5005	0,087	1,1329	0,111	2,3810	0,010

Cuadro 2. Contenido de boro en pimiento Luesia con la aplicación de 5 ppm de boro.

Semanas de tratamiento con boro (5 ppm)	Pimiento Luesia					
	Hoja		Tallo		Raíz	
	Media	D. Típica	Media	D. Típica	Media	D. Típica
1	11,355	0,033	1,3135	0,105	0,7077	0,015
2	33,507	0,015	1,0840	0,044	1,0592	0,021
3	82,868	0,052	1,1004	0,063	14,498	0,045
4	61,771	0,022	4,4254	0,086	21,614	0,011

Cuadro 3. Contenido de boro en pimiento Padrón con la aplicación de 0,5 ppm de boro.

Semanas de tratamiento con boro (0,5 ppm)	Pimiento Padrón					
	Hoja		Tallo		Raíz	
	Media	D. Típica	Media	D. Típica	Media	D. Típica
1	4,5313	0,022	1,5909	0,014	2,1370	0,016
2	1,0451	0,045	0,9301	0,025	0,7662	0,011
3	5,7950	0,033	0,9556	0,030	1,3573	0,034
4	2,6246	0,100	1,8155	0,022	1,9834	0,057

Cuadro 4. Contenido de boro en pimiento Padrón con la aplicación de 5 ppm de boro.

Semanas de tratamiento con boro (5 ppm)	Pimiento Padrón					
	Hoja		Tallo		Raíz	
	Media	D. Típica	Media	D. Típica	Media	D. Típica
1	4,7045	0,033	2,6997	0,012	1,2327	0,055
2	8,2158	0,020	5,4576	0,023	4,0892	0,010
3	2,9531	0,055	5,1111	0,011	2,8499	0,025
4	3,5560	0,122	2,8838	0,034	4,4176	0,014

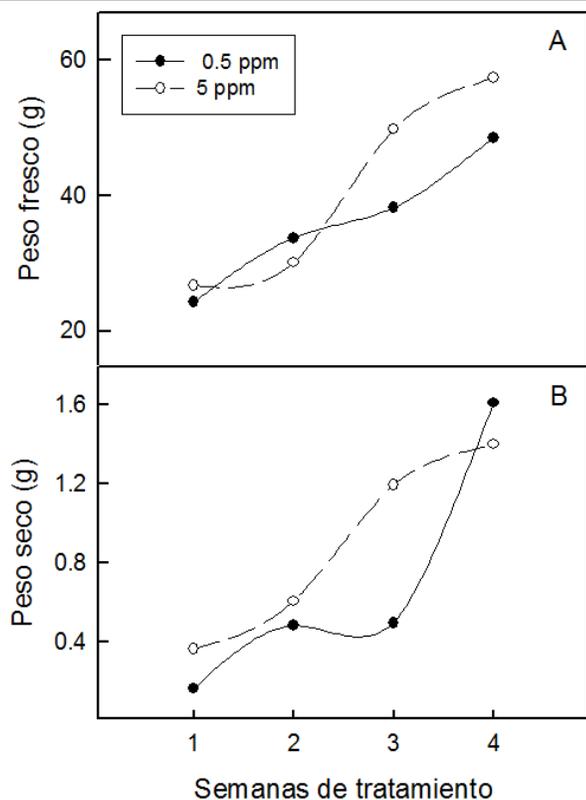


Figura 3. Producción de biomasa en términos de peso fresco (A) y peso seco (B) a lo largo de 4 semanas de tratamiento en pimiento Luesia.

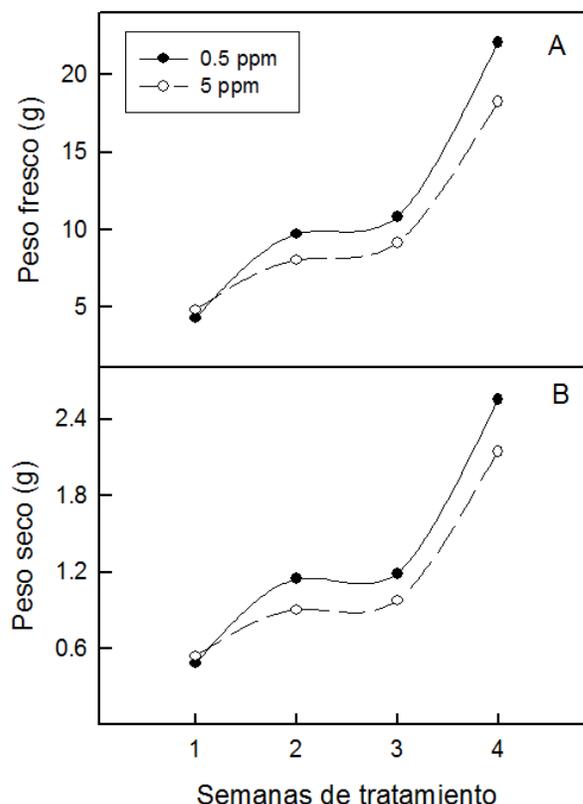


Figura 4. Producción de biomasa en términos de peso fresco (A) y peso seco (B) a lo largo de 4 semanas de tratamiento en pimiento de Padrón.

CONCLUSIÓN

A la vista de los resultados con el tratamiento de 5 ppm de B en el agua de riego, las dos variedades de pimiento (*Capsicum annuum* L.), demuestran, a pesar de sus diferencias, tener una importante tolerancia al boro.

LITERATURA CITADA

Aiteken, R.; D. Campbell and L. Bell. 1984. Properties of Australian fly ashes relevant to their agronomic utilization. Australian Journal of Soil Research 22: 443-453.

André Loué. 1988. El boro. Los Microelementos en la Agricultura. Ediciones Mundiprensa. p. 172

Anuario de Estadística Agraria. 1996. Consellería do Medio Rural. Xunta de Galicia.

Aznárez, J. and J. M. Mir. 1984. Spectrophotometric determination of boron with curcumin after

extraction with 2-methylpentane-2, 4-diol-chloroform. Analyst 109 (2): 183-188.

Bradford, G.R. 1966. Boron, In "Diagnostic criteria for plants and soils". University of California. Division of Agricultural Sciences, Chapter 4, 33-61.

Brown, P. H. and H. Hu. 1998a. Boron mobility and consequent management in different crops. Better Crops. 82 (2): 28-31.

Brown, P. H. and H. Hu. 1998b. Phloem boron mobility in diverse plant species. Botanica Acta. 111 (1): 331-335.

Camacho-Cristobal J.; J. Rexach and A. González-Fontes. 2008. Boron in plants: deficiency and toxicity. Journal of Integrative Plant Biology 50 (10): 1247-1255.

Candela, L. and J. Masich. 1984. Nuevas aportaciones al estudio de la contaminación por boro en un sector del delta del Llobregat. Tecnología del Agua 15: 42-51.

- Carrero, P.; J. L. Burguesa; M. Burguera and C. Rivas. 1993. A time-based injector applied to the flor injection spectrophotometric determination of boron in plant materials and soils. *Talanta* 40 (2): 1967-1974.
- Christensen, L. P.; R. H. Beede and W. L. Peacock 2006. Fall foliar sprays prevent boron-deficiency symptoms in grapes. *California Agriculture*. 60 (2): 100-103.
- De Acevedo, T. C.; G. Caseri de Luca; F. R. Nunes; F. B. Reis and J. F. Drug. 1998. *Analytical Chimica Acta* 374: 53-59.
- El-Maksoud, M. ; M. El-Beheidi M ; I. El-Oksh and M. El-Sawah. 1974. Response of sweet pepper to foliar nutrition whit zinc, boron and sucrose. *Zagazing Journal of Agricultural Research* 1 (1): 161-171.
- Ferrán, J.; A. Bonvalet and E. Casassas. 1988. New masking agents in the azomethine H methods for boron determination in plant tissue. *Agrochimica Vol.XXXII* (2,3): 171:181.
- Fujiwara, T. and T. Matoh. 2009. Plant Nutrition-roots of life for fundamental biology and better crops production. *Plant and Cell Physiology*. 50 (1): 2-4.
- Guest, C.; C Johnston; J. King; J. Allemen; J. Tishmach and L. Norton. 2001. Chemical characterization of synthetic soil from composting coal combustion and pharmaceutical by-products. *Journal of Environmental Quality* 30: 246-253.
- Gupta, U. 1979. Boron nutrition of crops. *Advances in Agronomy* 31: 273-307.
- Goldbach, H. E. and M. A. Wimmer. 2007. Boron in plants and animals: is there a role beyond cell-wall structure?. *Journal Plant Nutrition Soil Science*.170 (1): 39-48.
- Gorfinkiel, E. and A. G. Pollard. 1952. A modified procedure for determining boron in plant material and soil using 1,1-dianthrimide. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 3: 622-624.
- Krug, F.J.; J. Mortatti; L. C. R. Pessenda; E. A. G. Zagatto and H. Bergamin H. 1981. Flor inyection spectrophotometric determination of boron in plant material with azometine H. *Analytical Chimica Acta* 125: 29-35.
- LAN 2007/472. O. del 10/10/07. Reglamento Específico de Producción Integrada de Cultivos Hortícolas Protegidos (tomate, pimiento, berenjena, judía, calabacín, pepino, melón y sandía.)
- Lachica, M. 1976. Estudio sobre la determinación de boro en plantas con azometina H. *Colloque International sur le Cõntrole de l'alimentation des plantes cultivées*. Ed: A. Cottenie.
- Mello S.; A. Roque and K. Minami. 2002. Influência do boro no desenvolvimento e na composição mineral do pimentao. *Horticultura Brasileira* 20 (1): 99-102.
- Muñoz, E.; J. M. Fernández; M. J. Rodríguez; M. M. de la Fuente; S. Zaragoza y F. Silva. 1999. Efectos de la presencia de boro en aguas de riego. XXVII Reunión bienal de la Real Sociedad Española de Química. La Laguna (Tenerife).
- Nogueira, A.R.; S. M. B. Brienza; E. A G Zagatto; J. L. F. Costa Lima and A. N. Araújo. 1993. Multi-site detection in flow analysis. *Analytical Chimica Acta* 276: 121-125.
- Nyomora, A. M., Brown P. H, Pinney K. and Polito V. S. 2000. Foliar application of boron to almond trees affects pollen quality. *Journal of the American Society for Horticultura*. 125 (2): 265-270.
- Papadakis, I. E.; Dimassi K. N., Bosabalidis A. M., Therios I. N., Patakas A. and Giannakoula. 2004. Boron toxicity in Clementine mandarin plants grafted on two rootstocks. *Plant Science*. 166: 539-547.
- Porter, S.R.; S. C. Spindler and A. E. Widdowson. 1981. An improved automated colorimetric method for the determination of boron in extracts of soil, soil-less peat-based composts, plant materials and hydroponic solutions with azomethine H. *Commun. In soil Science and Plant Análisis* 12 (5): 461-473.
- Rodríguez, M.J; E. Novo; E. Muñoz y M. A. Bernal. 2005. Respuesta de dos variedades de plantas de pimiento a la irrigación con diferentes niveles de boro. XXX Reunión Bienal de la real Sociedad Española de Química (Lugo).

- Ryan, J.; M. Singh and S. Yau. 1998. Spatial variability of soluble boron in Syrian soils. *Soil and Tillage Research* 45: 407-417.
- Shanina, T.; N. Gelman and Mikhailovskaya. 1967. Quantitative analysis of heterorganic compounds spectrophotometric microdetermination of boron. *Journal of Analytical Chemistry USSR (Engl. Transl.)* 22: 663-667.
- Smallwood, C. 1998. Boron. *Who Guidelines for Drinking Water Quality* 2nd edition. p. 15-29.
- Stangoulis J.; R. Reid; P. Brown and R. Graham. 2001. Kinetic analysis of boron transport in chara. *Planta* 213: 142-146.
- Wang, Y.; Shi L., Cao X. and Xu F. 2007. Plant boron nutrition and boron fertilization in China. *Advances in Plant and Animal Boron Nutrition*. 93-101.
- Willis, A.L. 1970. An Automated procedure for the analysis of boron in plant tissue. *Soil Science and Plant Analysis* 1 (4): 205-211.
- Wilcox, L. 1960. Boron injury to plants. *Agricultura Information Bulletin*. USSDA 24: 3-8.
- Wolf, B. 1974. Improvements in the azometine H method for the determination of boron. *Comm. In Soil Science and Plant Analysis* 5 (1): 39-44.
- Yau, S. 2002. Interactions of boron-toxicity, drought, and genotypes on barley root growth, yield and other agronomic characters. *Australian Journal of Agricultural Research*. 53 (3): 347-354.
- Yau, S. K.; M. Nachit and J. Ryan. 1997. Variation in grow, development, and yield of durum wheat in response to high soil boron II. Differences between genotypes. *Australian Journal of Agricultural Research* 48: 951-957.
- Zaijun, L.; Z. Zhu; T. Jan; T. J. Hsu and P. Jiaomai. 1999. *Analytical Chimica Acta* 402: 253-257.
- Zenki, K. 1994. Spectrophotometric determination of boron in soil, water and plant samples. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 39:75-79.