

Cytokinin action revisited: leaf anatomical changes play a key role in 6-benzylaminopurine-driven growth promotion in pot-grown lettuce

Reanálisis de la acción de la citoquinina: los cambios anatómicos de la hoja juegan un papel clave en la promoción del crecimiento impulsada por la 6-bencilaminopurina en lechuga cultivada en maceta

Danilo Carnelos¹; Jorge Lozano-Miglioli^{2,3}; Ernesto Giardina¹; Jorge Tognetti^{2,3}; Adalberto Hugo Di Benedetto^{1,2*}

¹Universidad de Buenos Aires, Facultad de Agronomía. Av. 4453, San Martín, Buenos Aires, C1417DSE, ARGENTINA.

²Universidad Nacional de Mar del Plata, Facultad de Ciencias Agrarias. Ruta 226, Balcarce, Buenos Aires, B7620ZAA, ARGENTINA.

³Comisión de Investigaciones Científicas. La Plata, Provincia de Buenos Aires, ARGENTINA.

*Corresponding author: dibenede@agro.uba.ar

Abstract

Plants raised in small cell trays are often subjected to root growth restrictions. Root tips are a source of cytokinin, and insufficient biosynthesis and transport of this hormone to the aerial part severely impairs shoot development. Exogenous supply of cytokinin to the foliage has been shown to effectively counteract these effects in several horticultural crops, but the physiological processes involved are still unclear. The aim of this work was to study the effect of spraying the cytokinin 6-benzylaminopurine (BAP) on growth and development of plug lettuce seedlings focusing on the morpho-physiological mechanisms involved in plant response. Two experiments were conducted in a greenhouse. Lettuce (*Lactuca sativa* L. Crimor INTA) seedlings were grown for 35 days in 128-, 200- and 288-cells trays (17.37, 13.90 and 6.18 cm³·cell⁻¹ respectively), after which they were sprayed with BAP (6-benzylaminopurine) solutions (0, 5, 50 or 100 mg·L⁻¹) either immediately before transplant, or 7 days after transplant. Seedlings were transplanted into larger (3,000 cm³) pots in which they grew for further 60 days. Decreasing plug cell volume resulted in a steep decrease in plant net assimilation rate and leaf net photosynthetic rate, but the impact on the relative growth rate was somewhat lower due to an increased leaf area ratio. BAP sprays increased plant biomass accumulation and enhanced the development of photosynthetic area, in parallel with a strong promotion of carbon assimilation, and these effects were more remarkable in plants raised in smaller plugs, and when hormone was supplied at the pre-transplant stage.

Keywords: plug cell volume, root restriction, transplants, vegetables.

Resumen

Las plantas cultivadas en charolas de germinación de celdas pequeñas frecuentemente son sometidas a restricciones radicales. Las puntas de las raíces son una fuente de citoquinina, y la biosíntesis y el transporte de esta hormona a la parte aérea restringe severamente el desarrollo de los brotes. La aplicación de citoquinina al follaje ha demostrado ser efectiva para contrarrestar los efectos negativos en muchos cultivos hortícolas, pero los procesos fisiológicos involucrados permanecen inciertos. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de asperjar citoquinina 6-bencilaminopurina (BAP) sobre el crecimiento y desarrollo de plántulas de lechuga, concentrándose en los mecanismos morfo-fisiológicos relacionados con la respuesta de la planta. Se realizaron dos experimentos en un invernadero; para ello, se cultivaron plántulas de lechuga (*Lactuca sativa* L. Crimor INTA) durante 35 días en charolas de germinación de 128, 200 y 288 celdas (17.37, 13.90 y 6.18 cm³·celda⁻¹, respectivamente), después se asperjaron con soluciones de BAP (0, 5, 50 o 100 mg·L⁻¹), antes del trasplante o 7 días después de este. Las plántulas se trasplantaron en macetas más grandes (3,000 cm³), donde crecieron por 60 días. La disminución de la celda redujo la tasa de asimilación neta de la planta y la tasa fotosintética neta, pero el impacto en la tasa de crecimiento relativo fue un poco menor debido al incremento de la relación del área foliar. Las aspersiones de BAP incrementaron la acumulación de biomasa y ampliaron el desarrollo del área fotosintética; asimismo, se promovió la asimilación de carbono. Estos efectos fueron destacables en las plantas cultivadas en celdas menores, y cuando la hormona fue suministrada en la etapa de pre-trasplante.

Palabras clave: volumen de la celda, restricción radical, trasplantes, hortalizas.



Introduction

In modern vegetable production systems, transplanting has largely replaced direct seeding. The use of containerized transplants allows for an increase in yields, crop uniformity and a more predictable timing of production, in comparison with direct seeding. However, the need to reduce transplant costs has prompted the use of trays with small cells. This imposes a physical constraint on the development of the root system (Di Benedetto, 2011). The consequences of early root growth restrictions may span over the whole plant life cycle, negatively affecting production.

Lettuce is one of the most important vegetables worldwide (Stagnari, Galieni, & Pisante, 2015; Shehata, Schmidhalter, Valšíková, & Junge, 2016; Kim, Moon, Tou, Mou, & Waterland, 2016); it is often raised in small cell trays, and overcoming root restriction is thus needed to minimize yield losses. Root restriction effects on shoot growth are mainly caused by a low cytokinin supply from roots, and may be partially overcome by exogenous supply of this hormone (Richards & Rowe, 1977), but its application on vegetables has only recently gained full attention (Di Benedetto, Giardina, de Lojo, Gandolfo, & Hakim, 2020a). Cytokinins are synthesized in root apices and transported via the xylem to the shoot, where they promote cell division, leaf expansion, and photosynthetic apparatus development, and delay senescence, thus resulting in an enhanced plant development and size (Hönig, Plíhalová, Husíčková, Nisler, & Doležal, 2018; Glanz-Idan, Tarkowski, Turečková, & Wolf, 2020).

Exogenous supply of cytokinin to the foliage may counteract the effects of root restriction in several horticultural and ornamental species (Di Benedetto, Tognetti, & Galmarini, 2010; Di Benedetto et al., 2020b). Early sprays with the synthetic cytokinin 6-benzylaminopurine (BAP) often promote the relative growth rate in association with an enhanced net assimilation rate and photosynthetic rate, rather than with an increased carbon partitioning to the shoot (Di Benedetto, Tognetti, & Galmarini, 2015a). Cytokinin may enhance carbon fixation through the development and maintenance of functional chloroplasts and chlorophyll synthesis (Boonman et al., 2007; Cortleven & Schmülling 2015; Liu, Li, & Zhong, 2017).

Cytokinin supplied to *in vitro* plants has been found to increase chlorophyll contents (Muniz-de Oliveira et al., 2008a; Dobránszki & Drienyovszki, 2014), while in plants at an advanced stage it helps delay senescence (Hönig et al., 2018). However, virtually no changes in chlorophyll content were found after exogenous supply of BAP on root-restricted ornamental *Epipremnum aureum* (Di Benedetto et al., 2015a) and *Ficus benjamina* (Di Benedetto, Galmarini, & Tognetti, 2020c), despite

Introducción

En los sistemas de producción vegetal modernos, el trasplante ha sustituido la siembra directa de manera importante. El trasplante en contenedores permite un incremento en los rendimientos, uniformidad del cultivo y un mayor control en la calendarización de la producción, en comparación con la siembra directa. Sin embargo, la necesidad de reducir los costos del trasplante ha impulsado el uso de charolas de germinación con celdas pequeñas. Esto implica una limitación física al desarrollo del sistema radical (Di Benedetto, 2011). Las consecuencias de las restricciones al desarrollo temprano de la raíz pueden extenderse hacia el ciclo de vida de la planta, afectando negativamente la producción.

La lechuga es uno de los cultivos más importantes a nivel mundial (Stagnari, Galieni, & Pisante, 2015; Shehata, Schmidhalter, Valšíková, & Junge, 2016; Kim, Moon, Tou, Mou, & Waterland, 2016), y frecuentemente se cultiva en charolas de germinación de celdas pequeñas, por lo que es necesario superar las restricciones radicales para minimizar pérdidas en el rendimiento. Los efectos de la restricción radical sobre el crecimiento de los brotes son causados, principalmente, por un bajo suministro de citoquininas desde las raíces, y pueden ser parcialmente superados por el suministro exógeno de esta hormona (Richards & Rowe, 1977), pero su aplicación en hortalizas sólo ha cobrado atención recientemente (Di Benedetto, Giardina, de Lojo, Gandolfo, & Hakim, 2020a). Las citoquininas son sintetizadas en los ápices de las raíces y transportadas a través del xilema al brote, donde promueven la división celular, la expansión foliar y el desarrollo del aparato fotosintético, además de retrasar la senescencia, lo cual resulta en un mayor desarrollo y tamaño de la planta (Hönig, Plíhalová, Husíčková, Nisler, & Doležal, 2018; Glanz-Idan, Tarkowski, Turečková, & Wolf, 2020).

El suministro exógeno de citoquinina al follaje puede contrarrestar los efectos de la restricción radical en varias especies hortícolas y ornamentales (Di Benedetto, Tognetti, & Galmarini, 2010; Di Benedetto et al., 2020b). La aspersión temprana de citoquinina sintética 6-bencilaminopurina (BAP) a menudo promueve la tasa de crecimiento relativo relacionada con un aumento de la tasa de asimilación neta y la tasa fotosintética, más que con un aumento de la partición de carbono al brote (Di Benedetto, Tognetti, & Galmarini, 2015a). Asimismo, dicha hormona puede mejorar la fijación de carbono mediante el desarrollo y el mantenimiento de cloroplastos funcionales y la síntesis de clorofila (Boonman et al., 2007; Cortleven & Schmülling, 2015; Liu, Li, & Zhong, 2017).

Se ha comprobado que la citoquinina suministrada a plantas *in vitro* aumenta el contenido de clorofila (Muniz-

the promoting effect of the hormone on the net assimilation rate. Elucidating whether cytokinin may promote chlorophyll concentration in lettuce under root restrictions is important because of the association between chlorophyll and lettuce quality.

Cytokinins are also positively associated with nitrogen and photosynthetic protein concentration in leaves, by regulating the expression of genes involved in N uptake and carbon assimilation as well (Ruffel et al., 2011). Cytokinins also enhance N partitioning to leaves (Ookawa, Naruoka, Sayama, & Hirasawa, 2004) and within them (Gu et al., 2018) from older, shaded leaves to younger, sunlit ones, where they stimulate Rubisco expression (Ookawa et al., 2004; Boonman et al., 2007). Cytokinin delays senescence-associated declines in leaf nitrogen, protein and Rubisco levels, and in photosynthesis rates (Jordi et al., 2000).

Previous work on root-restricted *Epipremnum aureum* and *Ficus benjamina* showed an increased leaf N concentration as a consequence of BAP sprays (Di Benedetto et al., 2010; Di Benedetto, Galmarini, & Tognetti, 2018; 2020c), which was in turn associated with an increase in the net assimilation rate (NAR) over untreated controls. A possible increase in leaf nitrogen content of lettuce plants supplied with cytokinin could also be a desirable attribute from a nutritional quality point of view.

Changes in carbon assimilation prompted by cytokinin may also be the consequence of an increased CO₂ diffusion due to anatomical changes, although somewhat conflicting results has been reported. Bosselaers (1983) found a decreased stomatal density in *Phaseolus vulgaris* leaves treated with BAP, but not with another cytokinin (kinetin). Conversely, Gandolfo et al. (2014) found a BAP-induced increase in the stomatal density of *Impatiens wallerana*, which was more pronounced in seedlings subjected to more severe root restriction. This effect depended on BAP concentration, being lower doses (5 mg·L⁻¹) the most effective.

The proportion of intercellular spaces in leaf mesophyll, which impacts CO₂ diffusion within the leaf, is also modified by cytokinin, although reports are again conflicting. Bosselaers (1983) found a decrease in the proportion of intercellular air spaces in *Phaseolus vulgaris* by both kinetin and BAP, and a similar response was reported by Muniz-de Oliveira et al. (2008b) in *Annona glabra*. However, Gandolfo et al. (2014) found that in leaves of *Impatiens wallerana* the proportion of intercellular spaces increased when treated with BAP at a low concentration (5 mg·L⁻¹) but instead higher BAP concentrations reversed the effect.

Several reports indicate that cytokinin may promote an increase in leaf thickness (Bosselaers, 1983; Di Benedetto, Tognetti, & Galmarini, 2015b,

de Oliveira et al., 2008a; Dobránszki & Drienyovszki, 2014), mientras que en plantas en etapa avanzada ayuda a postergar la senescencia (Hönig et al., 2018). No obstante, no se encontraron cambios importantes en el contenido de clorofila después del suministro exógeno de BAP en algunas ornamentales con restricción de raíces como *Epipremnum aureum* (Di Benedetto et al., 2015a) y *Ficus benjamina* (Di Benedetto, Galmarini, & Tognetti, 2020c), a pesar del efecto promotor de la hormona en la tasa de asimilación neta. Es importante dilucidar si la citoquinina puede promover la concentración de clorofila en lechuga bajo restricciones radicales, dada la asociación entre la clorofila y la calidad de la lechuga.

Las citoquininas también se asocian positivamente con la concentración de nitrógeno y las proteínas fotosintéticas en las hojas, mediante la regulación de la expresión de los genes relacionados con la captación de nitrógeno y la asimilación de carbono (Ruffel et al., 2011). Dicha hormona también mejora el transporte del nitrógeno a las hojas (Ookawa, Naruoka, Sayama, & Hirasawa, 2004) y dentro de ellas (Gu et al., 2018), desde las hojas más viejas y sombreadas hacia las más jóvenes e iluminadas por el sol, donde se estimula la expresión de la rubisco (Ookawa et al., 2004; Boonman et al., 2007). La citoquinina retrasa la senescencia asociada con los niveles de nitrógeno, proteínas y rubisco de las hojas, así como las tasas de fotosíntesis (Jordi et al., 2000).

Estudios sobre *Epipremnum aureum* y *Ficus benjamina* con restricción radical mostraron un aumento en la concentración de nitrógeno foliar como resultado de las aspersiones de BAP (Di Benedetto et al., 2010; Di Benedetto, Galmarini, & Tognetti, 2018; 2020c), que a su vez se asoció con un aumento en la tasa de asimilación neta (TAN) respecto de los testigos no tratados. El aumento en el contenido de nitrógeno foliar en plantas de lechuga a las que se les suministró citoquinina también podría ser un atributo deseable desde el punto de vista de la calidad nutricional.

Los cambios en la asimilación de carbono provocados por la citoquinina también pueden ser consecuencia de un aumento de la difusión de CO₂ debido a cambios anatómicos, aunque se han reportado resultados contradictorios. Bosselaers (1983) reportó una disminución de la densidad estomática en hojas de *Phaseolus vulgaris* tratadas con BAP, pero no con otra citoquinina (kinetina). En cambio, Gandolfo et al. (2014) encontraron un aumento de la densidad estomática de *Impatiens wallerana* al aplicar BAP, el cual fue más pronunciado en las plántulas sometidas a una restricción radical severa. Este efecto dependió de la concentración de la BAP, siendo las dosis más bajas (5 mg·L⁻¹) las más efectivas.

La proporción de espacios intercelulares en el mesófilo de la hoja, los cuales influye en la difusión del CO₂

2018) which may also play a role on CO₂ diffusion. A possible increase in leaf thickness as a consequence of cytokinin application would be an interesting response in lettuce due to its association with shelf life (Lee, Nath, Goswami, & Nou, 2017).

Preliminary observations on BAP-sprayed summer butter-head lettuce raised in small pots suggest that this species also responds to exogenous cytokinin by increasing net assimilation rate, although the biological processes involved remain unknown (Campolongo et al., 2020). Understanding lettuce response to cytokinin under different degrees of root restrictions is needed not only to obtain higher commercial yields but also because of the potential impact on quality attributes. In order to optimize the commercial use of this treatment, information about the best timing (either pre- or post-transplant application) is also needed (de Lojo, Gandolfo, Boschi, Giardina, & Di Benedetto, 2019; Hakim, Gandolfo, Giardina, & Di Benedetto, 2017).

The aim of this work was to test the hypotheses that, first, BAP sprays may improve lettuce biomass accumulation through higher carbon assimilation, depending on plug cell size, hormone concentration, and moment of application, and second, that BAP-driven changes in chlorophyll and nitrogen content, together with changes in leaf anatomy, may explain the promotion in carbon assimilation by this hormone.

Materials and methods

The experiment was carried out in the campus of the Faculty of Agronomy, University of Buenos Aires, Argentina (34° 35' 59" LS and 58° 22' 23" LW) from March 6th to May 15th 2017 and repeated once from March 5th to May 21th 2018.

Lettuce (*Lactuca sativa* L.) Crimor INTA seeds were sown and grown in 128-, 200- and 288-cell trays (17.37, 13.90 and 6.18 cm³ per cell respectively) in a Klasmann411® substrate (GmbH, Germany) containing white peat 0-5 mm, pH: 6, structure extra fine with Hydro S as wetting agent for 35 days. Lettuce seedlings were sprayed with BAP (6-benzylaminopurine) (EC 214-927-5, Sigma-Aldrich®, USA) solutions (0, 5, 50 or 100 mg·L⁻¹) when the first true leaf pair were developed (pre-transplant treatments for BAP). Additionally, seedlings without pre-transplant treatment were sprayed with BAP seven days after transplant (post-transplant treatments). BAP was previously diluted in ethyl alcohol 80 %.

Lettuce seedlings were transplanted into 3 L pots filled with a *Sphagnum maguellanicum*-river waste-perlite (40:40:20, v/v) medium where they were grown for about 60 days. River waste or 'temperate peat' is the result of the accumulation of plant residues under an anaerobic environment, which is dredged from

dentro de ésta, también se modifica por la citoquinina, aunque algunos trabajos han reportado el efecto contrario. Bosselaers (1983) encontró una disminución en la proporción de espacios aéreos intercelulares en *Phaseolus vulgaris* tratado con kinetina y BAP; respuesta similar a la reportada por Muniz-de Oliveira et al. (2008b) en *Annona glabra*. Sin embargo, Gandolfo et al. (2014) encontraron que en las hojas de *Impatiens wallerana* la proporción de espacios intercelulares aumentó cuando fueron tratadas con 5 mg·L⁻¹ de BAP, pero con concentraciones mayores revirtieron el efecto.

Varios reportes indican que la citoquinina puede promover un incremento en el grosor de la hoja (Bosselaers, 1983; Di Benedetto, Tognetti, & Galmarini, 2015b, 2018), lo cual podría jugar un papel en la difusión del CO₂. El incremento en el grosor de la hoja, como consecuencia de la aplicación de citoquinina, sería una respuesta de interés en lechuga debido a su asociación con la vida útil pos-cosecha (Lee, Nath, Goswami, & Nou, 2017).

Investigaciones realizadas sobre lechugas cabeza de mantequilla de verano rociadas con BAP y cultivadas en pequeñas macetas sugieren que esta especie también responde a la citoquinina exógena, al aumentar la tasa de asimilación neta, aunque los procesos biológicos implicados continúan siendo desconocidos (Campolongo et al., 2020). La comprensión de la respuesta de la lechuga a la citoquinina bajo diferentes grados de restricciones radicales es necesaria, no sólo para obtener mayores rendimientos comerciales, sino también por su impacto potencial en los atributos de calidad. Para optimizar el uso comercial de este tratamiento, también se necesita información sobre el mejor momento de aplicación (ya sea previa o posterior al trasplante) (de Lojo, Gandolfo, Boschi, Giardina, & Di Benedetto, 2019; Hakim, Gandolfo, Giardina, & Di Benedetto, 2017).

El objetivo de este estudio fue evidenciar si las asperiones de BAP pueden mejorar la acumulación de biomasa en lechugas mediante una asimilación alta de carbono, dependiendo del tamaño de la celda, la concentración de la hormona y el momento de aplicación; asimismo, documentar los cambios causados por BAP en los contenidos de clorofila y nitrógeno, aunados a cambios en la anatomía de la hoja, lo cual podría explicar la promoción de la asimilación de carbono mediante esta hormona.

Materiales y métodos

El experimento se llevó a cabo en la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires, Argentina (34° 35' 59" latitud sur y 58° 22' 23" longitud oeste), desde el 6 de marzo hasta el 15 de mayo de 2017, y se repitió una vez del 5 de marzo al 21 de mayo de 2018.

river or lake banks placed under a subtropical climate with high rainfalls over 1,000 mm. At the beginning of the experiments, total porosity (%), air-filled porosity (%), container capacity (%) and bulk density ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$) were 63.50, 17.06, 10.06 and 0.35, respectively. Weeds were manually removed.

Plants were irrigated with high quality tap water (pH: 6.64; electrical conductivity: $0.486 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$) using intermittent overhead mist and one weekly fertigation (1N: 0.5P: 1K: 0.5Ca v/v). Nutrient concentration was modified according to seedling development. From radicle protrusion to first true leaves expansion: $50 \text{ mg}_\text{N}\cdot\text{L}^{-1}$; from this stage to transplant: $100 \text{ mg}_\text{N}\cdot\text{L}^{-1}$ and during pot experiments: $150 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Fertilization solution volume per pot varied according to pot volume.

Half hourly averages of the air temperature were measured using a data logger (H08-001-02, HOBO®, USA) protected from direct radiation by aluminum foil shades. Global solar radiation was recorded with a PAR HOBO data logger. The mean air temperatures ranged between 14.4 to 16.1°C and mean photosynthetic active radiation ranged between 13.46 to $17.33 \text{ mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{day}^{-1}$ during the experiments. Pots were arranged at a density of $6 \text{ plants}\cdot\text{m}^{-2}$ avoiding mutual shading.

Plants for destructive measurements were harvested (ten per treatment) at the transplant stage and afterwards at 20-days intervals. Roots were washed and root, stem, leaf and petioles fresh weights (FW) were recorded as well as root length. Dry weights (DW) were obtained after drying roots, stems and leaves to constant weight at 80°C for 96 h. The number of leaves was recorded and each leaf area was determined using the ImageJ® software.

The rate of leaf appearance (RLA), the relative leaf area expansion rate (RLAER), the relative growth rate (RGR), the net assimilation rate (NAR), the leaf area ratio (LAR) and were calculated according to Di Benedetto and Tognetti (2016).

RLA was calculated as the slope of the number of visible leaves (including unrolled ones $> 1 \text{ cm}$) vs. time (in weeks). RLAER was calculated as the slope of the regression of the natural logarithm of total leaf areas versus time (in days). Whole plant RGR was calculated as the slope of the linear regression of the natural logarithm of DW versus time (in days). Mean LAR was calculated as RGR/NAR . Mean NAR was calculated as:

$$\text{NAR} = \frac{k_w W_0 e^{k_w t}}{A_0 e^{k_a t}}$$

where W_0 is the extrapolated value of total DW (g) at time zero, k_w is the RGR (days^{-1}), A_0 is the extrapolated value of leaf area (cm^2) at time zero, k_a is the

Las semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) Crimor INTA se sembraron y cultivaron en charolas de germinación con 128, 200 y 288 celdas (17.37 , 13.90 y 6.18 cm^3 por celda, respectivamente), en sustrato Klamann411® (GmbH, Alemania) por 35 días. El sustrato contenía turba rubia de 0-5 mm, pH de 6 y estructura extra fina con Hydro S como agente humectante. Las plántulas de lechuga se asperjaron con diferentes concentraciones de BAP (0, 5, 50 o $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) (EC 214-927-5, Sigma-Aldrich®, EUA) cuando el primer par de hojas verdaderas se desarrollaron (tratamientos pre-trasplante para la BAP). Adicionalmente, las plántulas sin tratamiento pre-trasplante se asperjaron con BAP siete días después del trasplante (tratamientos post-trasplante). La BAP se diluyó previamente en alcohol etílico al 80 %.

Las plántulas de lechuga se trasplantaron a macetas de 3 L llenas con un medio de *Sphagnum maguellanicum* – residuo de río – perlita (40:40:20, v/v) y se cultivaron por 60 días aproximadamente. Los residuos de río son el resultado de la acumulación de residuos vegetales bajo un ambiente anaeróbico, que se degradaron en las orillas de ríos o lagos ubicados en climas subtropicales con precipitaciones pluviales mayores a 1,000 mm. Al principio del experimento, la porosidad total (%), la porosidad con aire (%), la capacidad del contenedor (%) y la densidad aparente ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$) fueron 63.50, 17.06, 10.06 y 0.35, respectivamente. Las malezas se retiraron manualmente.

Las plantas se regaron con agua de grifo de alta calidad (pH de 6.64 y conductividad eléctrica de $0.486 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$), utilizando rocío elevado intermitente y una fertirrigación semanal (1, 0.5, 1 y 1.5 de N:P:K:Ca, v/v). La concentración de nutrientes se modificó conforme el desarrollo de la plántula: $50 \text{ mg}_\text{N}\cdot\text{L}^{-1}$ desde la protrusión radical hasta la expansión de las primeras hojas verdaderas, $100 \text{ mg}_\text{N}\cdot\text{L}^{-1}$ de esta etapa hasta el trasplante y $150 \text{ mg}_\text{N}\cdot\text{L}^{-1}$ durante los experimentos en las macetas. El volumen de solución de la fertilización varió de acuerdo con el volumen de la maceta.

La temperatura ambiental promedio de cada media hora se registró utilizando un data logger (H08-001-02, HOBO®, EUA), protegido de la irradiación directa con papel aluminio. La radiación solar global se registró con un data logger PAR. Las temperaturas promedio oscilaron entre 14.4 y 16.1°C , y la radiación fotosintéticamente activa promedio varió de 13.46 a $17.33 \text{ mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{día}^{-1}$. Las macetas se acomodaron a una densidad de $6 \text{ plantas}\cdot\text{m}^{-2}$, evitando sombreado mutuo.

Las plantas para mediciones (diez por tratamiento) que implicasen su destrucción se cosecharon en la etapa del trasplante y posteriormente en intervalos de 20 días. Las raíces se lavaron y se registraron los pesos frescos (PF) de raíz, tallo, hoja y peciolo, así como la longitud de raíz. Los pesos secos (PS) se obtuvieron después

RLAER (days⁻¹), t is the time (days) at the midpoint of the experimental period and e is the base of natural logarithm.

The net photosynthetic rate was measured at ambient O₂ and CO₂ concentrations at a saturating photon flux density (> 1,700 μmol photons·m⁻²·s⁻¹) between 11:30 – 13:00 h of a sunny day just before final harvest. The youngest fully expanded leaf on three plants from each hormone treatment was selected for measurements, which were performed using a portable LICOR LI-6200 photosynthetic system (LI-COR®, USA).

For chlorophyll analysis, leaf disks were cut from the central area near the mid-vein of each leaf and placed in vials containing 3 cm³ of N, N-dimethyl formamide. Leaf disks were vacuum infiltrated and stored for three days in complete darkness. At this time, chlorophyll had completely eluted to the solvent. Absorbance at 647 and 664 nm was measured using a (Metrolab 1600, Metrolab UV-Vis, Argentina) spectrophotometer. Chlorophyll content was calculated as indicated by Inskeep and Bloom (1985).

Leaf nitrogen concentration at the final sampling was analysed using the Kjeldahl method. Leaf samples were placed in a tube containing sulfuric acid and heating for about 1.5 h raises the temperature to 310 to 320 °C. After a 1-h digestion at this temperature, the tubes were removed and cooling to 20 °C. The acid digest was diluted to 10 mL with water, and an aliquot of 3 mL was transferred to another tube where the Nessler reagent was added. Absorbance at 500 nm was measured using a spectrophotometer.

Leaf non-reducing sugars at the final sampling were analysed using the Anthrone method. Leaves were exhaustively extracted with 70 % (v/v) ethanol and the extracts evaporated to dryness in vacuum. They were then taken up in warm water and cleared with aluminium hydroxide. The Anthrone reagent (5 mL) was pipetted into Pyrex tubes and chilled in ice water. The solution to be tested (1 mL) was layered on the acid, cooling for a further 5 min and then thoroughly mixed while still immersed in ice water. The tubes were loosely fitted with corks, heated (80 °C) in a vigorously boiling, constant level water bath and then cooled in water for 5 min.

Samples of young fully expanded leaves were collected to examine leaf anatomy i.e. overall leaf thickness and volume of intercellular spaces, on the final harvest. Tissue from the middle region of the lamina was fixed in a mixture of 70 % ethanol, 5 % formalin, 5 % glacial acetic acid, and 20 % distilled water prior to dehydration in an ethanol and tert-butyl alcohol series. Samples were sectioned at 10 - 20 μm thick with a rotary

de secar las raíces, los tallos y las hojas a 80 °C hasta peso constante (aproximadamente 96 h). El número de hojas se registró y el área foliar de cada una de ellas se determinó utilizando el programa ImageJ®.

La tasa de aparición foliar (TAF), la tasa de expansión relativa del área foliar (TERAF), la tasa de crecimiento relativo (TCR), la tasa de asimilación neta (TAN) y la relación de área foliar (RAF) se calcularon de acuerdo con Di Benedetto y Tognetti (2016).

La TAF se calculó como la pendiente del número de hojas visibles (incluidas las desenrolladas > 1 cm) contra el tiempo (en semanas). La TERAF se calculó como la pendiente de la regresión del logaritmo natural de las áreas foliares totales contra el tiempo (en días). La TCR de toda la planta se determinó como la pendiente de la regresión lineal del logaritmo natural de los PS contra el tiempo (en días), y la TCR promedio se calculó a partir de la TCR/TAN. La TAN promedio se calculó como:

$$TAN = \frac{k_w W_0 e^{k_w t}}{A_0 e^{k_a t}}$$

donde W_0 es el valor extrapolado del PS (g) en el momento cero, k_w es la TCR (días⁻¹), A_0 es el valor extrapolado del área foliar (cm²) en el momento cero, k_a es la TERAF (días⁻¹), t es el tiempo (días) en el punto medio del periodo experimental y e es la base de logaritmo natural.

La tasa fotosintética neta se midió en concentraciones ambientales de O₂ y CO₂ a una densidad de flujo de fotones en saturación (> 1,700 μmol de fotones·m⁻²·s⁻¹), entre las 11:30 y las 13:00 horas de un día soleado, justo antes de la cosecha final. Se seleccionó la hoja más joven, completamente expandida, de tres plantas de cada tratamiento hormonal para las mediciones, las cuales se realizaron en un sistema fotosintético portátil (LI-COR LI-6200, LI-COR®, EUA).

Para el análisis de clorofila, se cortaron discos de las hojas de la zona central, cerca de la nervadura central, y se colocaron en viales que contenían 3 cm³ de N, N-dimetilformamida. Dichos discos se infiltraron al vacío y se almacenaron durante tres días en completa oscuridad, momento en el cual la clorofila se había eluido completamente hacia el disolvente. La absorbancia a 647 y 664 nm se midió con un espectrofotómetro (Metrolab 1600, Metrolab UV-Vis, Argentina), y el contenido de clorofila se calculó según lo indicado por Inskeep y Bloom (1985).

La concentración de nitrógeno foliar en el muestreo final se analizó por el método Kjeldahl. Las muestras de hojas se introdujeron en un tubo con ácido sulfúrico y se calentaron por aproximadamente 1.5 h para elevar

microtome and stained with safranin-crystal violet-fast green. Data obtained were the means of three leaves per treatment using ten leaf cross-sections per leaf. Quantitative anatomical data were obtained using Image Pro Express version 6.0 (Media Cybernetics, USA).

The experimental design was a randomized factorial with three blocks of five single-pot replications of each treatment combination (plug cell volume × BAP concentration × experiment). Data were subjected to three-way analysis of variance using STATISTICA 8 (StatSoft) software. Since there were no significant differences between the two yearly experiments, they were considered together for analysis (Table 1). Means were separated by Tukey's test ($P \leq 0.05$). Slopes from straight-line regressions of RLAER, RGR and NAR were tested using the SMATR package (Warton, Duursma, Falster, & Taskinen, 2012).

la temperatura hasta 310-320 °C. Después de 1 h de digestión, los tubos se retiraron y se enfriaron hasta 20 °C. El ácido digerido se diluyó a 10 mL con agua y se transfirió una alícuota de 3 mL a otro tubo, donde se añadió el reactivo de Nessler. La absorbancia a 500 nm se midió con un espectrofotómetro.

Los azúcares no reductores de las hojas en el muestreo final se analizaron por el método de la Antrona. Las hojas se extrajeron con etanol al 70 % (v/v) y los extractos se evaporaron al vacío hasta su secado. Posteriormente, se pasaron por agua caliente y se aclararon con hidróxido de aluminio. El reactivo Antrona (5 mL) se pipeteó en tubos Pyrex y se enfrió en agua helada. La solución a ensayar (1 mL) se colocó en capas sobre el ácido, enfriando durante 5 min más, y luego se mezcló vigorosamente mientras seguía sumergida en agua helada. Los tubos se cubrieron

Table 1. Results of a three-way analysis of variance with cell size (CS), BAP treatment and experiment (df = 2, 6 and 1, respectively) as factors.

Cuadro 1. Resultados del análisis de varianza de tres vías con volumen de celda (VC), tratamiento BAP y experimento (gl = 2, 6 y 1, respectivamente) como factores.

Variables/Variable	CS/VC	BAP	Experiment/ Experimento	CS x BAP/ VC x BAP	CS x E/ VC x E	BAP x E	CS x BAP x E/ VC x BAP x E
Rate of leaf appearance/ Tasa de aparición foliar	***	***	ns	***	ns	ns	ns
Relative leaf area expansion rate/ Tasa de expansión relativa del área foliar	***	***	ns	***	ns	ns	ns
Total leaf area/ Área foliar total	***	***	ns	***	ns	ns	ns
Individual leaf area/ Área foliar individual	***	***	ns	***	ns	ns	ns
Leaf thickness/ Grosor de la hoja	***	***	ns	**	ns	ns	ns
Intercellular spaces/ Espacios intercelulares	***	***	ns	**	ns	ns	ns
Chlorophyll/ Clorofila	*	*	ns	*	ns	ns	ns
Leaf nitrogen/ Nitrógeno foliar	***	***	ns	***	ns	ns	ns
Non-reducing sugars/ Azúcares no reductores	***	***	ns	***	ns	ns	ns
Relative growth rate/ Tasa de crecimiento relativo	***	***	ns	***	ns	ns	ns
Net assimilation rate/ Tasa de asimilación neta	***	***	ns	***	ns	ns	ns
Leaf area ratio/ Relación de área foliar	***	***	ns	***	ns	ns	ns
Photosynthetic rate/ Tasa fotosintética	***	***	ns	***	ns	ns	ns

*** = $P \leq 0.001$; ** = $P \leq 0.01$; * = $P \leq 0.05$; ns = no significant.

*** = $P \leq 0.001$; ** = $P \leq 0.01$; * = $P \leq 0.05$; ns = no significativo.

Results

Leaf area development

During the experiment, both the rate of leaf appearance (RLA) and the relative leaf area expansion rate (RLAER) were directly related to plug cell volume in control plants. A BAP spray at both pre- and post-transplant significantly increased RLA and RLAER (Table 2).

Leaf area development variables (including RLA, RLAER, total leaf area and individual leaf area) were highly significantly affected by BAP treatment, cell size, and their interaction (Table 1). At the last harvest, lettuce plants from the lower plug cell volume (288-cell trays) had significantly lower both totals and individuals leaf areas than those grown in larger plug cells. Pre-transplant BAP spray at any dose significantly increased leaf area, irrespective of plug cell size. However, maximum leaf area promotion in 200-cell plants was achieved at higher BAP concentrations than in 128-cell and 288-cell plants. Post-transplant BAP spray also promoted leaf area accumulation in comparison with controls (Table 3).

Biomass accumulation

A highly significant effect of cell size, BAP treatment, and their interaction was observed for RGR, NAR and LAR (Table 1). The effect of exogenous BAP sprays on lettuce DW accumulation is shown in Figure 1. Strong

holgadamente con tapones de corcho, se calentaron a 80 °C en un baño de agua de ebullición vigorosa y nivel constante, y luego se enfriaron en agua durante 5 min.

En la cosecha final, se colectaron muestras de hojas jóvenes completamente expandidas para examinar la anatomía foliar; es decir, el grosor total de la hoja y el volumen de los espacios intercelulares. El tejido de la región media de la lámina se fijó en una mezcla de etanol, formalina, ácido acético glacial y agua destilada (70, 5, 5 y 20 %, respectivamente) antes de deshidratarlo en una serie de etanol y alcohol tert-butilico. Las muestras se seccionaron en trozos de 10 a 20 µm con un micrótopo rotatorio y se tiñeron con safranina cristal-violeta verde rápido. Los datos obtenidos fueron las medias de tres hojas por tratamiento, utilizando diez cortes transversales por hoja. Los datos anatómicos cuantitativos se obtuvieron con el programa Image Pro Express versión 6.0 (Media Cybernetics, EUA).

El diseño experimental fue un factorial aleatorizado con tres bloques de cinco repeticiones de cada tratamiento (volumen de celda x concentración de BAP x experimento). La unidad experimental fue una maceta. Los datos se sometieron a un análisis de varianza de tres vías utilizando el programa STATISTICA 8 (StatSoft). Dado que no hubo diferencias significativas entre los dos experimentos anuales, estos se agruparon para el análisis (Cuadro 1). La comparación de medias se realizó mediante la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$). Las

Table 2. Rate of leaf appearance (RLA) and relative leaf area expansion rate (RLAER) of lettuce plants grown in 128-, 200- or 288-cell trays¹ and sprayed with pre- or post-transplant cytokinin 6-benzylaminopurine (BAP) (5, 50 or 100 mg·L⁻¹).

Cuadro 2. Tasa de aparición foliar (TAF) y tasa de expansión relativa del área foliar (TERAF) de plantas de lechuga cultivadas en charolas de germinación de 128, 200 o 288 celdas por charola de germinación y asperjadas con citoquinina 6-bencilaminopurina (BAP) en pre- y post-trasplante (5, 50 o 100 mg·L⁻¹).

Treatments/ Tratamiento	RLA (leaves·week ⁻¹)/ TAF (hojas·semana ⁻¹)			RLAER (cm ² ·cm ⁻² ·day ⁻¹)/ TERAF (cm ² ·cm ⁻² ·día ⁻¹)		
	128-cell/ 128 celdas	200-cell/ 200 celdas	288-cell/ 288 celdas	128-cell/ 128 celdas	200-cell/ 200 celdas	288-cell/ 288 celdas
Control/ Testigo	0.241 bA ^z	0.229 cB	0.188 dC	0.0616 eA	0.0552 dB	0.0520 dC
BAP pre-5	0.248 abA	0.242 aA	0.196 cB	0.0645 cA	0.0656 bA	0.0615 dB
BAP pre-50	0.256 abA	0.241 aB	0.228 bC	0.0633 dA	0.0631 cA	0.0622 dB
BAP pre-100	0.255 abA	0.241 aB	0.252 aA	0.0652 cA	0.0644 bA	0.0655 bA
BAP post-5	0.264 aA	0.238 aB	0.256 aA	0.0668 cA	0.0635 cB	0.0672 aA
BAP post-50	0.267 aA	0.242 aB	0.253 aB	0.0680 bA	0.0650 abB	0.0650 bB
BAP post-100	0.271 aA	0.243 aA	0.232 bB	0.0728 aA	0.0678 aB	0.0636 cC

¹Different lower case letters indicate significant differences (Tukey, $P \leq 0.05$) between control and BAP-sprayed treatments. Different capital letters indicate significant differences (Tukey, $P \leq 0.05$) between plants from different cell number per tray. RLA and RLAER slopes were in all cases statistically different from zero (Tukey, $P \leq 0.001$).

²Medias con letras minúsculas iguales no difieren estadísticamente (Tukey, $P \leq 0.05$) entre el testigo y los tratamientos con aspersiones de BAP. Medias con letras mayúsculas iguales no difieren estadísticamente (Tukey, $P \leq 0.05$) entre plantas de charolas de diferente número de celdas. Las pendientes de la RLA y la TERAF fueron estadísticamente diferentes de cero (Tukey, $P \leq 0.001$) en todos los casos.

Table 3. Total leaf area and mean individual leaf area at final harvest in lettuce plants raised in 128-, 200- and 288-cell trays, and sprayed at either pre- or post-transplant stage with cytokinin 6-benzylaminopurine (BAP) (5, 50 or 100 mg·L⁻¹) (n = 6).

Cuadro 3. Área foliar total y área foliar individual promedio en la cosecha final de plantas de lechuga cultivadas en charolas de germinación de 128, 200 y 288 celdas, y asperjadas en pre- o post-trasplante con citoquinina 6-bencilaminopurina (BAP) (5, 50 o 100 mg·L⁻¹) (n = 6).

Treatments / Tratamiento	Total leaf area (cm ² ·plant ⁻¹) / Área foliar total (cm ² ·planta ⁻¹)			Individual leaf area (cm ² ·leaf ⁻¹) / Área foliar individual (cm ² ·hoja ⁻¹)		
	128-cell / 128 celdas	200-cell / 200 celdas	288-cell / 288 celdas	128-cell / 128 celdas	200-cell / 200 celdas	288-cell / 288 celdas
Control/Testigo	506.2 bA ^a	503.5 cA	328.0 eB	21.62 cA	21.11 cA	16.77 dB
BAP pre-5	662.0 aA	611.8 aB	415.2 dC	25.14 bA	26.86 aA	17.97 dB
BAP pre-50	603.1 aA	570.3 bB	568.6 aB	25.00 bA	23.76 bB	23.58 aB
BAP pre-100	561.3 aA	572.7 bA	509.2 bB	23.49 bcA	23.54 bA	20.74 cB
BAP post-5	623.3 aA	580.5 bB	575.7 aB	24.71 bA	23.53 bB	23.44 aB
BAP post-50	693.3 aA	490.2 cC	530.7 bB	27.73 aA	24.88 bB	21.13 bC
BAP post-100	605.1 aB	636.4 aA	478.2 cC	24.75 bB	26.92 aA	22.07 abC

^aDifferent lower case letters indicate significant differences (Tukey, $P \leq 0.05$) between control and BAP-sprayed treatments. Different capital letters indicate significant differences (Tukey, $P \leq 0.05$) between plants from different cell number per tray.

^aMedias con letras minúsculas iguales no difieren estadísticamente (Tukey, $P \leq 0.05$) entre el testigo y los tratamientos con aspersiones de BAP. Medias con letras mayúsculas iguales no difieren estadísticamente (Tukey, $P \leq 0.05$) entre plantas de charolas de germinación de diferente número de celdas.

RGR increases, relative to controls, were found in 288-grown plants although, in a lesser extent, most BAP concentrations increased RGR also in 128- and 200-cell grown plants (Figure 1A). Regarding RGR components, a relative increase in NAR (Figure 1B) and a relative decrease in LAR were found as a consequence of BAP application. In both cases, the higher responses were found in 288-cell grown plants.

To analyze the contribution of changes in NAR and in LAR to BAP-driven variation in RGR, a regression analysis was performed, which showed that NAR was strongly and directly associated with RGR, while an inverse, moderate association between RGR and LAR was found (Figure 2).

Carbon fixation

The photosynthetic rate at the end of the experiment was highly significantly affected by cell size, BAP treatment, and their interaction (Table 1). The photosynthetic rate showed a similar response pattern than NAR, this is, a general significant increase with BAP application in relation to control plants, with the highest responses being observed in 288-cell grown plants (Figure 3A). In agreement with these responses, the photosynthetic rate was linearly correlated with NAR (Figure 3B).

Leaf anatomy

Both leaf anatomical variables considered, i.e. leaf thickness and percentage of intercellular spaces at

pendientes de las regresiones de TERAF, TCR y TAN se obtuvieron con el programa SMATR (Warton, Duursma, Falster, & Taskinen, 2012).

Resultados

Desarrollo del área foliar

Durante el experimento, la TAF y la TERAF estuvieron directamente relacionadas con el volumen de la celda en las plantas testigo. Una aplicación de BAP, tanto en pre- como en post-trasplante, incrementó significativamente la TAF y la TERAF (Cuadro 2).

Las variables de desarrollo del área foliar (incluyendo TAF, TERAF, área foliar total y área foliar individual) fueron afectadas significativamente por el tratamiento con BAP, el tamaño de celda y su interacción (Cuadro 1). En la última cosecha, las plantas de lechuga cultivadas en charolas de germinación de 288 celdas tuvieron áreas foliares totales e individuales significativamente más bajas que las cultivadas en charolas de germinación con celdas más grandes. La aspersión con BAP antes del trasplante, en cualquier dosis, incrementó significativamente el área foliar, independientemente del tamaño de la celda. No obstante, la máxima promoción de área foliar en las plantas de las charolas de germinación con 200 celdas se alcanzó a concentraciones de BAP más altas que en las plantas cultivadas en charolas de germinación de 128 y 288 celdas. La aspersión de BAP en post-trasplante también promovió la acumulación de área foliar en comparación con el testigo (Cuadro 3).

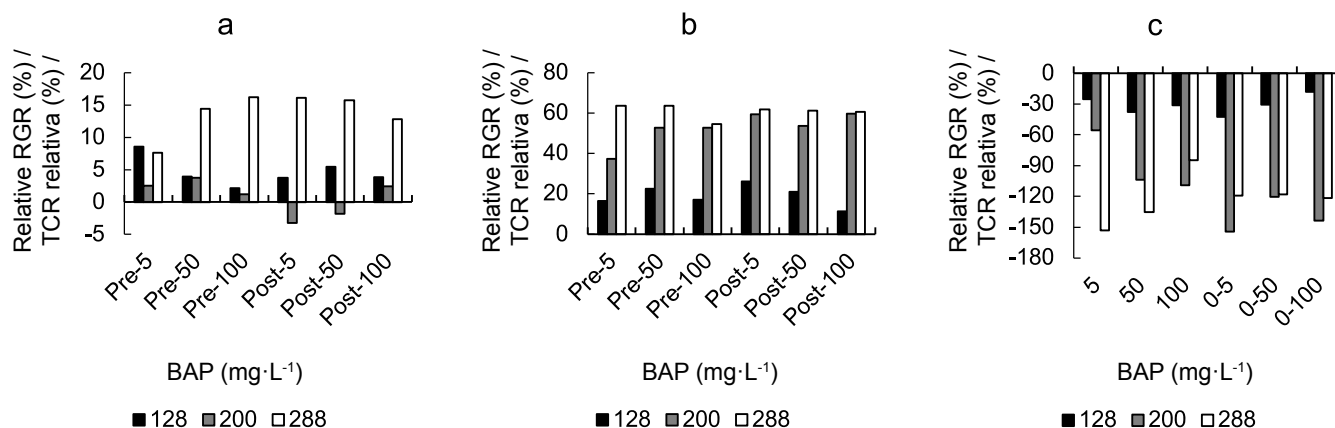


Figure 1. The effect of a 5, 50, or 100 mg·L⁻¹ cytokinin 6-benzylaminopurine (BAP) spray at the pre- or post-transplant stage on lettuce mean: a) relative growth rate (RGR), b) net assimilation rate (NAR) and c) leaf area ratio (LAR). Data are expressed as percentages of change in control values. Control data from 128-, 200- and 288-cell trays were RGR: 0.0823, 0.0808, 0.0788 (g·g⁻¹·day⁻¹); NAR: 21.28, 16.73, 13.21 (g·cm⁻²·day⁻¹ × 10⁻⁵) and LAR: 287.09, 537.97, 611.49 (cm²·g⁻¹), respectively.

Figura 1. Efecto del asperjado de diferentes concentraciones (5, 50, o 100 mg·L⁻¹) de citoquinina 6-bencilaminopurina (BAP) en pre- o post-trasplante: a) tasa de crecimiento relativo (TCR), b) tasa de asimilación neta (TAN) y c) relación de área foliar (RAF) en lechugas. Los datos están expresados como porcentajes de cambio en los valores del testigo. Los datos de los testigos de las charolas de germinación de 128, 200 y 288 celdas fueron 0.0823, 0.0808 y 0.0788 (g·g⁻¹·día⁻¹) para TCR, 21.28, 16.73 y 13.21 (g·cm⁻²·día⁻¹ × 10⁻⁵) para TAN, y 287.09, 537.97 y 611.49 (cm²·g⁻¹) para RAF, respectivamente.

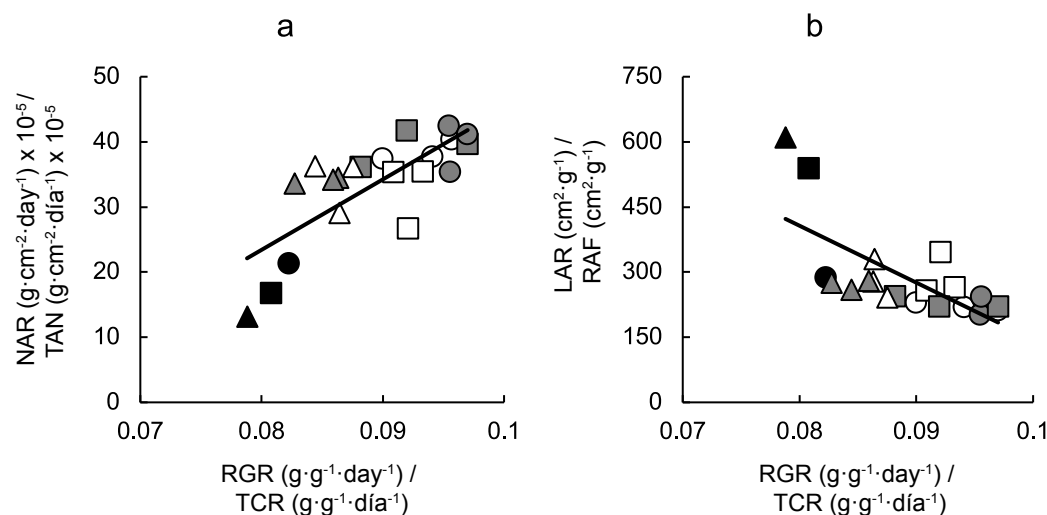


Figure 2. Contribution of changes: a) net assimilation rate (NAR) and b) leaf area ratio (LAR) to variation in relative growth rate (RGR) of lettuce plants grown in 128-, 200- or 288-cell trays and sprayed with pre- or post-transplant cytokinin 6-benzylaminopurine (BAP) sprays at 0, 5, 50 or 100 mg·L⁻¹. Linear regression equations are NAR = 1081.60RGR - 63.11 ($r^2 = 0.581$; $P < 0.001$); LAR = -13106.00RGR + 1455.30 ($r^2 = 0.495$; $P < 0.05$). Symbols indicate controls (black), pre-transplant BAP (white) and post-transplant BAP (grey), corresponding to 128- (circles); 200- (squares) and 288- (triangles) cell trays.

Figura 2. Contribución de los cambios: a) tasa de asimilación neta (TAN) y b) relación de área foliar (RAF) sobre la variación en la tasa de crecimiento relativo (TCR) de plantas de lechuga cultivadas en charolas de germinación de 128, 200 y 288 celdas, y asperjadas con diferentes concentraciones (0, 5, 50 o 100 mg·L⁻¹) de citoquinina 6-bencilaminopurina (BAP) en pre- y post-trasplante. Las ecuaciones de la regresión lineal son TAN = 1081.60TCR - 63.11 ($r^2 = 0.581$; $P < 0.001$) y RAF = -13106.00TCR + 1455.30 ($r^2 = 0.495$; $P < 0.05$). Los símbolos indican testigos (negro), BAP en pre-trasplante (blanco) y BAP en post-trasplante (gris), correspondientes a charolas de germinación de 128 (círculos), 200 (cuadros) y 288 (triángulos) celdas.

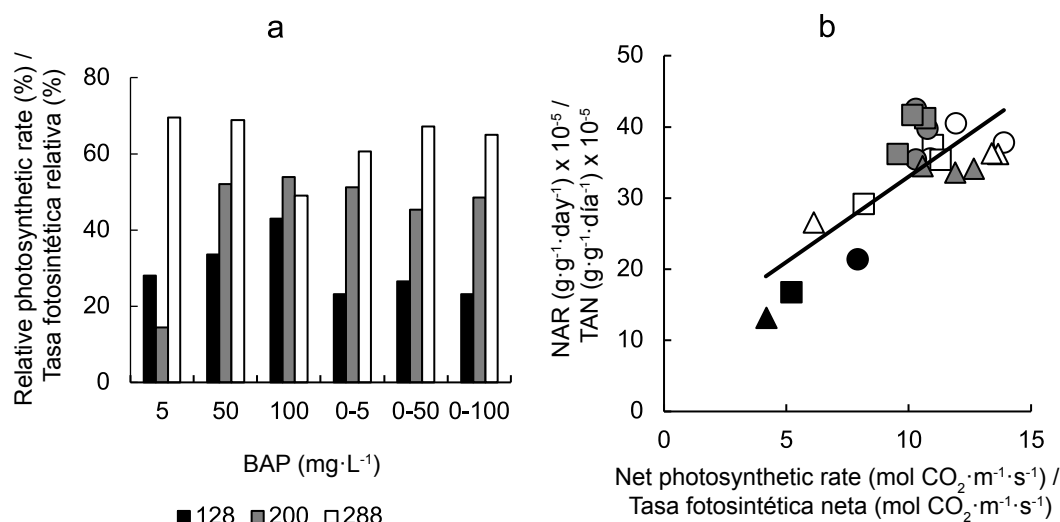


Figure 3. The effect of a 5, 50, or 100 mg·L⁻¹ cytokinin 6-benzylaminopurine (BAP) spray application on the relative photosynthetic rate (a). Data are expressed as percentage changes observed following BAP application at 5, 50, or 100 mg·L⁻¹ relative to plants sprayed with 0 mg·L⁻¹ BAP. Panel b showed the inter-relationship between the net assimilation rate (NAR) and the net photosynthetic rate ($\mu\text{mol CO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Linear regression equation was $\text{NAR} = 2.40 \text{ photosynthetic rate} + 9.00$ ($r^2 = 0.631$; $P \leq 0.001$). Symbols indicate controls (black), pre-transplant BAP (white) and post-transplant BAP (grey), corresponding to 128- (circles); 200- (squares) and 288- (triangles) cell trays. Control data from 128-, 200- and 288- cell trays were 7.93, 5.22 and 4.16 mol CO₂·m⁻²·s⁻¹, respectively.

Figura 3. Efecto de la aplicación de diferentes concentraciones (5, 50, o 100 mg·L⁻¹) de citoquinina 6-bencilaminopurina (BAP) sobre la tasa fotosintética relativa (a). Los datos están expresados como cambios porcentuales observados después de la aplicación de BAP. El panel b muestra la interrelación entre la tasa de asimilación neta (TAN) y la tasa fotosintética neta (mol CO₂·m⁻²·s⁻¹). La ecuación de la regresión lineal fue $\text{TAN} = 2.40\text{tasa fotosintética} + 9.00$ ($r^2 = 0.631$; $P \leq 0.001$). Los símbolos indican testigos (negro), BAP en pre-trasplante (blanco) y BAP en post-trasplante (gris), correspondientes a charolas de germinación de 128 (círculos), 200 (cuadros) y 288 (triángulos) celdas. Los datos de los testigos de las charolas de germinación de 128, 200 y 288 celdas fueron 7.93, 5.22 y 4.16 mol CO₂·m⁻²·s⁻¹, respectivamente.

the end of the experiments, were highly significantly ($P \leq 0.001$) affected by cell size, BAP treatment, and their interaction (Table 1). The lowest values of leaf thickness and proportion of intercellular spaces were observed in plants grown in the smallest cells. BAP sprays at either pre- or post-transplant stage increased values of leaf thickness irrespective of cell size. On the other hand, pre-transplant BAP applications were more effective than post-transplant ones regarding the promotion of intercellular spaces percentage (Table 4).

Leaf metabolite concentration

The effects of cell size, BAP treatment, and their interaction were significant at the $P < 0.05$ level for chlorophyll, and at the $P < 0.001$ level for nitrogen and sugar contents (Table 1). In control plants, chlorophyll concentration was unaffected by cell size, and BAP sprays has relatively little effect, although in some cases differences between treatments or cell size were statistically significant (Table 5). Leaf nitrogen content per unit leaf area of control plants was the highest in 128-cell plants, and values decreased in parallel with

Acumulación de biomasa

Se observó un efecto altamente significativo del tamaño de celda, el tratamiento con BAP y su interacción, sobre la TCR, TAN y RAF (Cuadro 1). El efecto de las aplicaciones exógenas de BAP sobre la acumulación de PS en la lechuga se muestra en la Figura 1. Se encontraron incrementos de la TCR, en relación con los testigos, en las plantas cultivadas en charolas de germinación de 288 celdas; sin embargo, la mayoría de las concentraciones de BAP aumentaron la TCR también en las plantas cultivadas en 128 y 200 celdas, aunque en menor medida (Figura 1A). En cuanto a los componentes de la TCR, se encontró un incremento relativo en la TAN (Figura 1B) y una disminución relativa en la RAF, como consecuencia de la aplicación de BAP. En ambos casos, las respuestas más altas se encontraron en las plantas cultivadas en charolas de germinación de 288 celdas.

Para analizar la contribución de los cambios en la TAN y en la RAF sobre la variación debida a la BAP en la TCR, se realizó un análisis de regresión, el cual mostró que la TAN estaba fuerte y directamente asociadas con la TCR.

Table 4. Leaf thickness and percentage leaf intercellular spaces in the youngest fully expanded leaf at final harvest of lettuce plants grown in 128-, 200- or 288-cell trays and sprayed with cytokinin 6-benzylaminopurine (BAP) at 0, 5, 50 or 100 mg·L⁻¹ at the pre- or post-transplant stage (n = 6).

Cuadro 4. Grosor de la hoja y porcentaje de espacios intracelulares foliares en la hoja más joven completamente expandida de plantas de lechuga cultivadas en charolas de germinación de 128, 200 y 288 celdas, y asperjadas con diferentes concentraciones (0, 5, 50 o 100 mg·L⁻¹) de citoquinina 6-bencilaminopurina (BAP) en pre- y post-trasplante (n = 6).

Treatments/ Tratamientos	Leaf thickness (µmm)/ Grosor de hoja (µmm)			Intercellular spaces (%)/ Espacios intercelulares (%)		
	128-cell/ 128 celdas	200-cell/ 200 celdas	288-cell/ 288 celdas	128-cell/ 128 celdas	200-cell/ 200 celdas	288-cell/ 288 celdas
Control/Testigo	178.03 cA ^z	164.77 cA	157.20 bB	60.91 cA	38.06 bB	23.84 cC
BAP pre-5	227.27 bA	213.64 bB	202.65 aC	71.90 aB	47.32 aB	47.77 aB
BAP pre-50	242.42 aB	263.64 aA	206.44 aC	66.93 aA	29.64 cC	43.77 aB
BAP pre-100	261.36 aB	280.30 aA	212.12 aC	72.99 aA	36.60 bB	42.94 aB
BAP post-5	196.97 bB	217.80 bA	177.27 bC	59.92 cA	29.72 cB	24.33 cB
BAP post-50	200.76 bA	215.91 bA	155.30 bB	68.89 aA	35.61 bB	29.47 bB
BAP post-100	210.23 bA	202.65 bA	160.88 bB	63.00 bA	32.81 bB	34.08 bB

^zDifferent lower case letters indicate significant differences (Tukey, $P \leq 0.05$) between control and BAP-sprayed treatments. Different capital letters indicate significant differences (Tukey, $P \leq 0.05$) between plants from different cell numbers per tray.

^zMedias con letras minúsculas iguales no difieren estadísticamente (Tukey, $P \leq 0.05$) entre el testigo y los tratamientos con aspersiones de BAP. Medias con letras mayúsculas iguales no difieren estadísticamente (Tukey, $P \leq 0.05$) entre plantas de charolas de germinación de diferente número de celdas.

Table 5. Leaf chlorophyll content and leaf nitrogen content at final harvest of lettuce plants grown in 128-, 200- or 288-cell trays and sprayed with cytokinin 6-benzylaminopurine (BAP) at 0, 5, 50 or 100 mg·L⁻¹ at the pre- or post-transplant stage (n = 6).

Cuadro 5. Contenido de clorofila foliar y nitrógeno foliar en la cosecha final de plantas de lechuga cultivadas en charolas de germinación de 128, 200 y 288 celdas, y asperjadas con diferentes concentraciones (0, 5, 50 o 100 mg·L⁻¹) de citoquinina 6-bencilaminopurina (BAP) en pre- y post-trasplante (n = 6).

Treatments/ Tratamiento	Chlorophyll (mg·m ⁻²)/ Clorofila (mg·m ⁻²)			Leaf nitrogen (mg·cm ⁻²)/ Nitrógeno foliar (mg·cm ⁻²)		
	128-cell/ 128 celdas	200-cell/ 200 celdas	288-cell/ 288 celdas	128-cell/ 128 celdas	200-cell/ 200 celdas	288-cell/ 288 celdas
Control/Testigo	213.50 aA ^z	211.69 bA	205.22 cA	0.971 dA	0.652 cdB	0.567 bC
BAP pre-5	195.92 bB	192.04 cB	228.49 aA	1.439 aA	0.489 dB	0.425 cB
BAP pre-50	211.94 aB	224.87 aA	209.88 cB	1.160 bA	0.723 cB	0.645 aC
BAP pre-100	208.59 aB	214.79 bB	233.10 aA	1.141 bA	0.648 cdB	0.436 cC
BAP post-5	175.23 cC	186.35 cB	202.90 cA	0.965 dA	0.458 dB	0.371 dC
BAP post-50	211.95 aA	191.52 cB	219.70 bA	1.033 cA	1.085 bA	0.560 bB
BAP post-100	213.76 aB	229.01 aA	184.02 dC	1.422 aB	1.563 aA	0.532 bC

^zDifferent lower case letters indicate significant differences (Tukey, $P \leq 0.05$) between control and BAP-sprayed treatments. Different capital letters indicate significant differences (Tukey, $P \leq 0.05$) between plants from different cell number per tray.

^zMedias con letras minúsculas iguales no difieren estadísticamente (Tukey, $P \leq 0.05$) entre el testigo y los tratamientos con aspersiones de BAP. Medias con letras mayúsculas iguales no difieren estadísticamente (Tukey, $P \leq 0.05$) entre plantas de charolas de germinación de diferente número de celdas.

decreasing cell size (Table 5). Significant increases due to BAP application were observed depending on BAP concentration and timing of application, especially in 128- and 200-cell plants.

Non-reducing sugar concentration was substantially lower in plants grown in the smallest cells, in comparison with 128- and 200-cell plants, irrespective of BAP treatment. In general, BAP application resulted in higher

Mientras tanto, se encontró una asociación inversa y moderada entre TCR y RAF (Figura 2).

Fijación de carbono

La tasa fotosintética al final del experimento se vio afectada significativamente por el tamaño de celda, el tratamiento con BAP y su interacción (Cuadro 1). Esta variable mostró un comportamiento similar al de la

concentrations, independently of cell size (Table 6).

Relationships between carbon fixation and leaf anatomical variables

Both the net assimilation rate (Figure 4a) and the photosynthetic rate (Figure 4b) were directly correlated with leaf thickness, and the best fits were obtained with curvilinear equations (Figure 4a and b, respectively). Both variables related with carbon fixation were also directly correlated with the proportion of intercellular spaces (Figure 4c and d).

TAN; es decir, un incremento general significativo con la aplicación de BAP en relación con las plantas testigo, observándose las mayores respuestas en las plantas cultivadas en charolas de germinación de 288 celdas (Figura 3A). De acuerdo con estos resultados, la tasa fotosintética se correlacionó linealmente con la TAN (Figura 3B).

Anatomía foliar

Al final de los experimentos, el grosor de la hoja y el porcentaje de espacios intercelulares se vieron

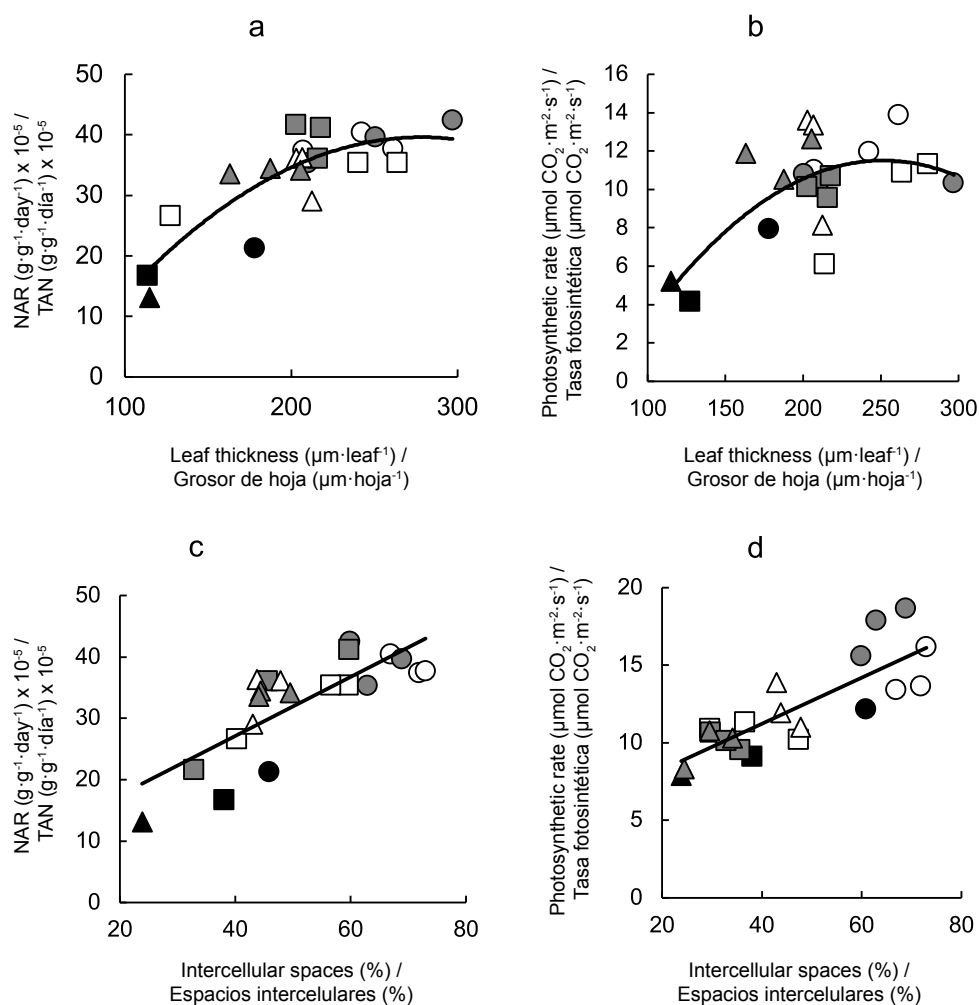


Figure 4. Relationship between carbon assimilation and leaf anatomical variables. Linear regression equations are: a) $\text{NAR} = -0.0008\text{leaf thickness}^2 + 0.455\text{leaf thickness} - 23.63$ ($r^2 = 0.726$; $P \leq 0.001$), b) $\text{photosynthetic rate} = -0.0004\text{leaf thickness}^2 + 0.181\text{leaf thickness} - 11.25$ ($r^2 = 0.442$; $P \leq 0.001$), c) $\text{NAR} = 0.48\text{intercellular spaces} + 7.87$ ($r^2 = 0.618$; $P \leq 0.001$) and d) $\text{photosynthetic rate} = 0.15\text{intercellular spaces} + 5.28$ ($r^2 = 0.679$; $P \leq 0.001$). Symbols indicate controls (black), pre-transplant BAP (white) and post-transplant BAP (grey), corresponding to 128- (circles); 200- (squares) and 288- (triangles) cell trays.

Figura 4. Relación entre la asimilación de carbono y las variables anatómicas foliares. Las ecuaciones de regresión fueron: a) $\text{TAN} = -0.0008\text{grosor de la hoja}^2 + 0.455\text{grosor de la hoja} - 23.63$ ($r^2 = 0.726$; $P \leq 0.001$), b) $\text{tasa fotosintética} = -0.0004\text{grosor de la hoja}^2 + 0.181\text{grosor de la hoja} - 11.25$ ($r^2 = 0.442$; $P \leq 0.001$), c) $\text{TAN} = 0.48\text{espacios intercelulares} + 7.87$ ($r^2 = 0.618$; $P \leq 0.001$) y d) $\text{tasa fotosintética} = 0.15\text{espacios intercelulares} + 5.28$ ($r^2 = 0.679$; $P \leq 0.001$). Los símbolos indican testigos (negro), BAP en pre-trasplante (blanco) y BAP en post-trasplante (gris), correspondientes a charolas de germinación de 128 (círculos), 200 (cuadros) y 288 (triángulos) celdas.

Table 6. Shoot non-reducing sugar concentration at final harvest of lettuce plants grown in 128-, 200- or 288-cell trays and sprayed with cytokinin 6-benzylaminopurine (BAP) at 0, 5, 50 or 100 mg·L⁻¹ at the pre- or post-transplant stage (n = 6).

Cuadro 6. Concentración de azúcares no reductores en los brotes en la cosecha final de plantas de lechuga cultivadas en charolas de germinación de 128, 200 o 288 celdas y asperjadas con diferentes concentraciones (0, 5, 50 o 100 mg·L⁻¹) de citoquinina 6-bencilaminopurina (BAP) en pre- y post-trasplante (n = 6).

Treatments/ Tratamiento	Non-reducing sugars (mg·g ⁻¹ fresh weight)/Azúcares no reductores (mg·g ⁻¹ peso fresco)		
	128-cell/128 celdas	200-cell/200 celdas	288-cell/288 celdas
Control/Testigo	3.11 dA ^z	2.97 dB	1.23 dC
BAP pre-5	3.60 cA	3.59 cA	1.70 bB
BAP pre-50	5.95 bA	5.60 bA	1.57 bA
BAP pre-100	6.62 aB	7.75 aA	1.13 bcC
BAP post-5	3.91 cA	3.97 cA	2.51 aB
BAP post-50	3.62 cA	3.58 cA	1.53 bB
BAP post-100	6.63 aA	1.83 eB	1.39 cdB

^zDifferent lower case letters indicate significant differences (Tukey, $P \leq 0.05$) between control and BAP-sprayed treatments. Different capital letters indicate significant differences (Tukey, $P \leq 0.05$) between plants from different cell number per tray.

^zMedias con letras minúsculas iguales no difieren estadísticamente (Tukey, $P \leq 0.05$) entre el testigo y los tratamientos con aspersiones de BAP. Medias con letras mayúsculas iguales no difieren estadísticamente (Tukey, $P \leq 0.05$) entre plantas de charolas de germinación de diferente número de celdas.

Relationships between carbon fixation and leaf nitrogen content

A direct association between both NAR, or photosynthetic rate, and leaf nitrogen content per unit area was observed. The best fits were obtained with a curvilinear relationship, plant response reaching an optimum above (Figure 5a and b), although correlations were somewhat weaker than those observed between carbon fixation and leaf anatomical variables.

Relationship between leaf thickness and anatomical or metabolic variables of leaves

The possibility of autocorrelation between leaf thickness and other variables analyzed (percentage of intercellular spaces, nitrogen per unit area, chlorophyll per unit area, non-reducing sugars concentration) was studied through regression analyses. While non-significant relationships between the intercellular spaces proportion (Figure 6a), leaf nitrogen content (Figure 6b), chlorophyll content (Figure 6c) and leaf thickness were observed, a significant correlation between non-reducing sugars content and leaf thickness (Figure 6d) ($r^2 = 0.606$) was found.

When all photosynthetic rate data were plotted against leaf mesophyll volume (Figure 7a) a significant direct relationship ($r^2 = 0.612$) was observed. However, closer correlations were found by analyzing pre- and post-transplant data by separate ($r^2 = 0.757$ and $r^2 = 0.866$, respectively) (Figure 7).

afectados significativamente ($P \leq 0.001$) por el tamaño de celda, el tratamiento con BAP y su interacción (Cuadro 1). Los valores más bajos en ambas variables se observaron en las plantas cultivadas en las charolas de germinación con las celdas más pequeñas. Las aspersiones de BAP, tanto en pre- como en post-trasplante, aumentaron los valores de grosor de la hoja, independientemente del tamaño de celda. Por otra parte, las aplicaciones de BAP antes del trasplante fueron más efectivas que las posteriores en cuanto a la promoción del porcentaje de espacios intercelulares (Cuadro 4).

Concentración de metabolitos foliares

Los efectos del tamaño de celda, el tratamiento BAP y su interacción fueron significativos ($P < 0.05$) para la clorofila y altamente significativos ($P < 0.001$) para los contenidos de nitrógeno y azúcar (Cuadro 1). En las plantas testigo, la concentración de clorofila no se vio afectada por el tamaño de celda, y las aspersiones de BAP tuvieron poco efecto, aunque en algunos casos las diferencias entre los tratamientos o el tamaño de celda fueron estadísticamente significativas (Cuadro 5). El contenido de nitrógeno en la hoja por unidad de superficie foliar de las plantas testigo fue el más alto en las charolas de germinación de 128 celdas, y los valores disminuyeron paralelamente a la disminución del tamaño de la celda (Cuadro 5). Se observaron aumentos significativos ($P \leq 0.05$) debidos a la aplicación de BAP en función de la concentración y del momento de la aplicación, especialmente en charolas de germinación de 128 y 200 celdas.

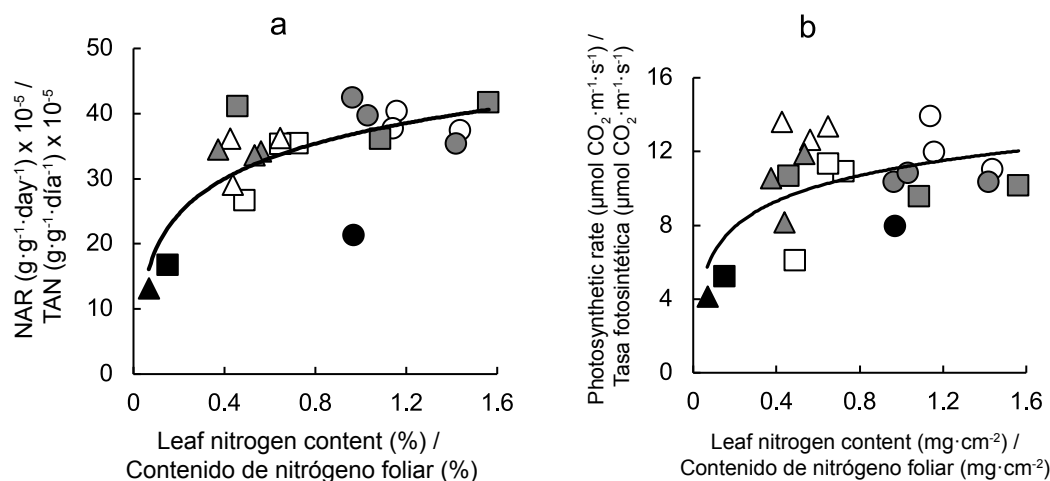


Figure 5. Relationship between carbon assimilation and leaf metabolic variables. Linear regression equations are: a) $NAR = 7.78 \text{ leaf nitrogen content} + 37.12$ ($r^2 = 0.558$; $P \leq 0.001$) y b) $\text{photosynthetic rate} = 2.00 \text{ leaf nitrogen content}^2 + 11.14$ ($r^2 = 0.338$; $P \leq 0.01$). Symbols indicate controls (black), pre-transplant BAP (white) and post-transplant BAP (grey), corresponding to 128- (circles); 200- (squares) and 288- (triangles) cell trays.

Figura 5. Relación entre la asimilación de carbono y las variables metabólicas foliares. Las ecuaciones de regresión fueron: a) $TAN = 7.78 \text{ contenido de nitrógeno foliar} + 37.12$ ($r^2 = 0.558$; $P \leq 0.001$) y b) $\text{tasa fotosintética} = 2.00 \text{ contenido de nitrógeno foliar}^2 + 11.14$ ($r^2 = 0.338$; $P \leq 0.01$). Los símbolos indican testigos (negro), BAP en pre-trasplante (blanco) y BAP en post-trasplante (gris), correspondientes a charolas de germinación de 128 (círculos), 200 (cuadros) y 288 (triángulos) celdas.

Discussion

A large amount of evidence, gathered from studies on a wide range of horticultural and ornamental species, indicates that root restriction effects due to small transplant pots may be at least partially overcome by the exogenous supply of cytokinin (Di Benedetto et al., 2020b). Applications of this hormone either in pre- or early post-transplant stages often reverts root restriction by promoting carbon assimilation, ultimately resulting in recovery of plant development and biomass accumulation in a manner that may depend on severity of root restriction, hormone concentration and timing of cytokinin application (Di Benedetto et al., 2020a). Our present data on BAP-sprayed lettuce seedlings subjected to root-restriction are largely in agreement with previous reports on other species, since an increased plant biomass accumulation, and a promotion of photosynthetic area development (Table 2) associated with faster leaf production and higher individual leaf area, were observed.

Decreasing plug cell volume from 128 to 288 cells per tray resulted in a steep decrease in NAR (Figure 1b) and net photosynthesis values (Figure 3a). However, the impact on RGR was in general smaller (Figure 1a), due to the progressive increase in LAR observed in plants grown in smaller cells (Figure 1c). Then, the change in resource allocation, prioritizing leaf area

La concentración de azúcares no reductores fue sustancialmente menor en las plantas cultivadas en las celdas más pequeñas, en comparación con las plantas de 128 y 200 celdas, independientemente del tratamiento con BAP. En general, la aplicación de BAP dio lugar a concentraciones más elevadas, sin importar el tamaño de celda (Cuadro 6).

Relación entre la fijación de carbono y las variables anatómicas foliares

Tanto la tasa de asimilación neta (Figura 4a) como la tasa fotosintética (Figura 4b) se correlacionaron directamente con el grosor de la hoja, y los mejores ajustes se obtuvieron con ecuaciones curvilíneas (Figura 4a y b, respectivamente). Ambas variables relacionadas con la fijación de carbono también se correlacionaron directamente con la proporción de espacios intercelulares (Figura 4c y d).

Relación entre fijación de carbono y contenido de nitrógeno foliar

Se observó una asociación directa entre la TAN, o la tasa fotosintética, y el contenido de nitrógeno foliar por unidad de superficie. Los mejores ajustes se obtuvieron con una relación curvilínea, alcanzando la respuesta de la planta un óptimo por encima (Figura 5a y b), aunque las correlaciones fueron un poco más débiles

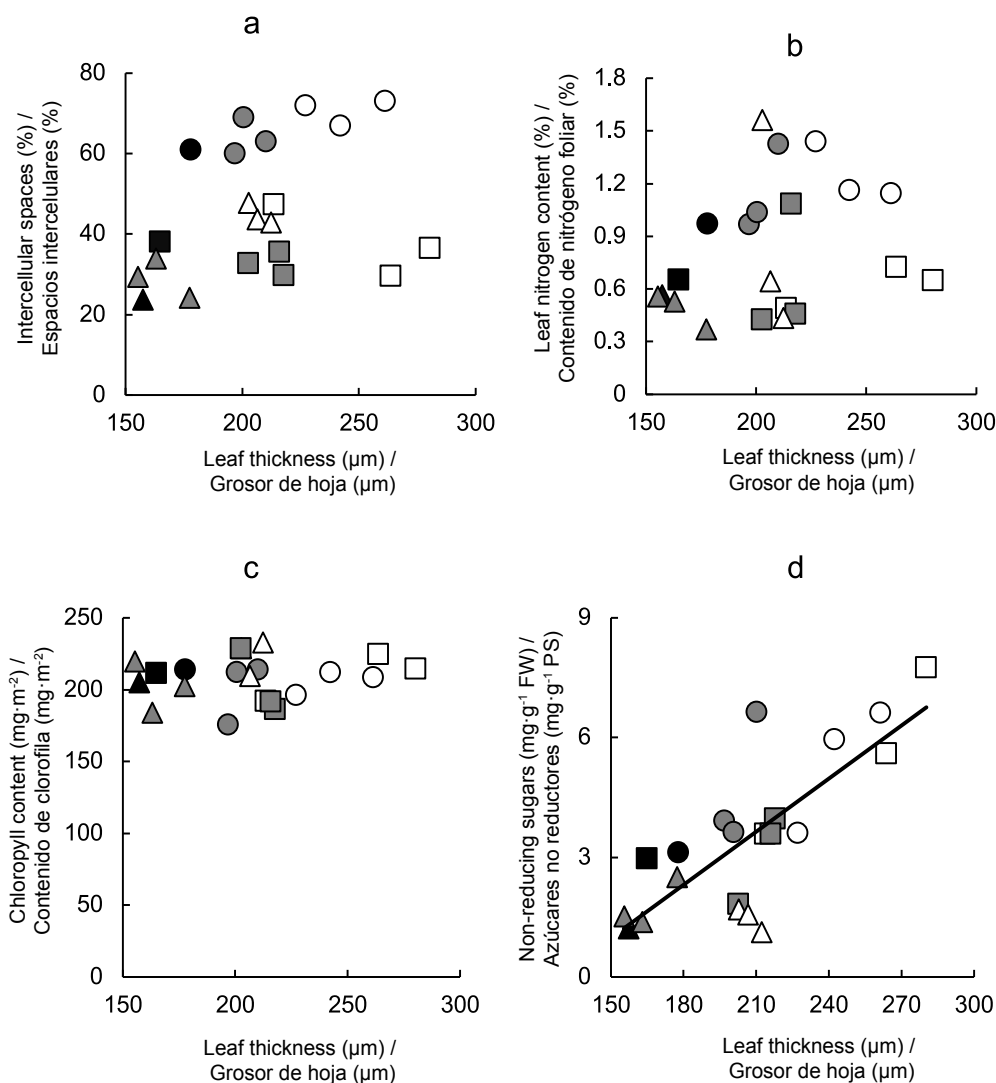


Figure 6. Relationship between leaf thickness and anatomical and metabolic variables of leaves. Linear regression equations are: a) Intercellular spaces = $0.15 \text{ leaf thickness} + 14.17$ ($r^2 = 0.103$), b) leaf nitrogen content = $0.001 \text{ leaf thickness} + 0.22$ ($r^2 = 0.076$), c) chlorophyll content = $0.07 \text{ leaf thickness} + 194.25$ ($r^2 = 0.021$) y d) non-reducing sugars = $0.04 \text{ leaf thickness} - 5.67$ ($r^2 = 0.606$; $P \leq 0.001$). Symbols indicate controls (black), pre-transplant BAP (white) and post-transplant BAP (grey), corresponding to 128- (circles); 200- (squares) and 288- (triangles) cell trays.

Figura 6. Relación entre grosor de la hoja y las variables anatómicas y metabólicas de las hojas. Las ecuaciones de la regresión lineal son: a) Espacios intercelulares = $0.15 \text{ grosor de la hoja} + 14.17$ ($r^2 = 0.103$), b) contenido de nitrógeno foliar = $0.001 \text{ grosor de la hoja} + 0.22$ ($r^2 = 0.076$), c) contenido de clorofila = $0.07 \text{ grosor de la hoja} + 194.25$ ($r^2 = 0.021$) y d) azúcares no reductores = $0.04 \text{ grosor de la hoja} - 5.67$ ($r^2 = 0.606$; $P \leq 0.001$). Los símbolos indican testigos (negro), BAP en pre-trasplante (blanco) y BAP en post-trasplante (gris), correspondientes a charolas de germinación de 128 (círculos), 200 (cuadros) y 288 (triángulos) celdas.

development, can be considered as an adaptive response tending to compensate for the strong negative impact of root restriction on carbon fixation. Impairment of carbon assimilation due to root restriction has been reported before for horticultural and ornamental crops such as tomato (Shi, Ding, Dong, Zhou, & Yu, 2008), pothos (Di Benedetto et al., 2015b) and ficus (Di Benedetto et al., 2020c).

que las observadas entre la fijación de carbono y las variables anatómicas foliares.

Relación entre el grosor de la hoja y las variables anatómicas o metabólicas de las hojas

La posibilidad de autocorrelación entre el grosor de la hoja y otras variables analizadas (porcentaje de espacios

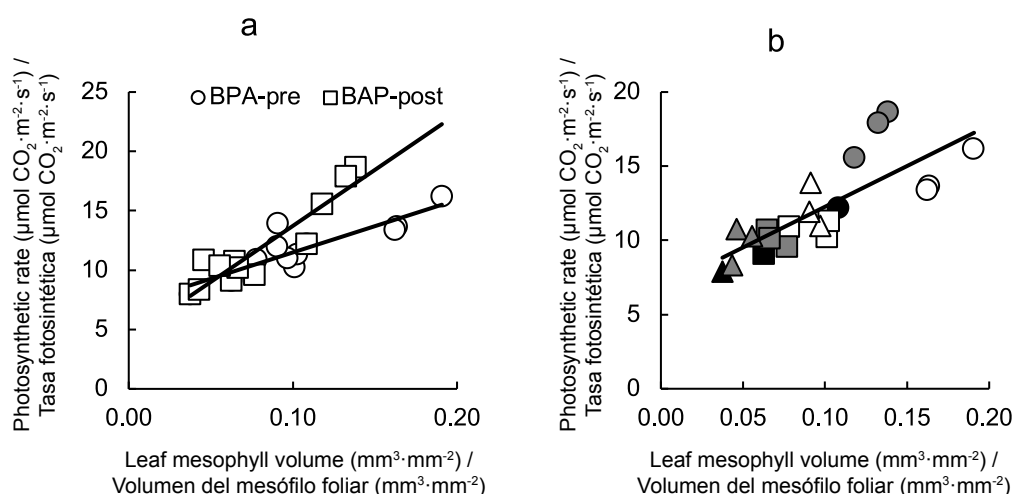


Figure 7. Relationship between photosynthetic rate and leaf mesophyll volume for lettuce plants BAP-sprayed at pre- or post-transplant (a). Plate B showed data differences for each treatment (plug cell number and BAP sprays). Linear regression equation is: $\text{photosynthetic rate}_{\text{BAP pre-transplant}} = 0.0004\text{air space volume} + 7.06$ ($r^2 = 0.757$), $\text{photosynthetic rate}_{\text{BAP post-transplant}} = 0.0009\text{air space volume} + 4.29$ ($r^2 = 0.866$), and $\text{photosynthetic rate}_{\text{Combined data}} = 54.92\text{air space volume} + 6.77$ ($r^2 = 0.612$). Symbols indicate controls (black), pre-transplant BAP (white) and post-transplant BAP (grey), corresponding to 128- (circles); 200- (squares) and 288- (triangles) cell trays.

Figura 7. Relación entre la tasa fotosintética y el volumen del mesófilo foliar de plantas de lechuga aspejadas con BAP en pre- y post-trasplante (a). La figura b muestra la diferencia de los datos para cada tratamiento (número de celdas y aspersiones con BAP). Las ecuaciones de regresión lineal son: $\text{tasa fotosintética}_{\text{BAP pre-trasplante}} = 0.0004\text{volumen de espacio aéreo} + 7.06$ ($r^2 = 0.757$), $\text{tasa fotosintética}_{\text{BAP post-trasplante}} = 0.0009\text{volumen de espacio aéreo} + 4.29$ ($r^2 = 0.866$) y $\text{tasa fotosintética}_{\text{datos combinados}} = 54.92\text{volumen de espacio aéreo} + 6.77$ ($r^2 = 0.612$). Los símbolos indican testigos (negro), BAP en pre-trasplante (blanco) y BAP en post-trasplante (gris), correspondientes a charolas de germinación de 128 (círculos), 200 (cuadros) y 288 (triángulos) celdas.

Exogenous cytokinin application, as expected, generally counteracted the negative impact of root restriction on plant growth, resulting in higher leaf area development and whole plant growth than untreated controls (Table 3), but especially, in increased mean NAR (Figure 1c) and net photosynthetic rate (Figure 3a). Furthermore, BAP sprays were relatively more effective in promoting NAR on seedlings grown in the smallest plugs (i.e. those cultivated in 288-cell trays). This is consistent with expectations, since plants under severe root restriction are supposed to produce the least amount of cytokinin, which are known to be synthesized in root apices (Zhang et al., 2014).

Previous work on other species has shown that plant response to increasing BAP concentration of sprays often reaches a plateau, suggesting the existence of an optimum hormone concentration in tissues (Araki, Rattin, Di Benedetto, & Miravé, 2007). In agreement with this, our results show that doubling BAP concentration from 50 to 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ had no significant effect on growth promotion, similar responses being found when BAP was applied either at the pre- or post-transplant stages.

intercelulares, nitrógeno por unidad de superficie, clorofila por unidad de superficie y concentración de azúcares no reductores) se estudió mediante un análisis de regresión. Mientras que se observaron relaciones no significativas entre la proporción de espacios intercelulares (Figura 6a), el contenido de nitrógeno de la hoja (Figura 6b), el contenido de clorofila (Figura 6c) y el grosor de la hoja, se encontró una correlación significativa entre el contenido de azúcares no reductores y el grosor de la hoja (Figura 6d) ($r^2 = 0.606$).

Cuando todos los datos de la tasa fotosintética se graficaron contra el volumen del mesófilo foliar (Figura 7a), se encontró una relación directa significativa ($r^2 = 0.612$). Sin embargo, relaciones más altas se encontraron al analizar los datos de pre- y post-trasplante por separado ($r^2 = 0.757$ y $r^2 = 0.866$, respectivamente) (Figura 7).

Discusión

Diversos artículos realizados en especies hortícolas y ornamentales indica que los efectos de la restricción de raíces debida a macetas de trasplante pequeñas pueden ser, al menos parcialmente, superados mediante el

Despite promoting leaf area development, BAP treatment resulted in a decrease in LAR, and this was the most remarkable in plants grown in smaller cells. This decrease in LAR could be attributed to an enhanced root growth together with lower specific leaf area, which was in turn associated with increased leaf thickness (Table 5) and higher sugar concentration in sprayed plants, in comparison with controls (Table 6). Thus, BAP-treated plants showed morpho-physiological changes that tended to compensate for those responses elicited by root restriction.

The physiological processes involved in cytokinin-mediated growth promotion in root-restricted plants have received relatively little attention. Cytokinin are well known to promote the development of the photosynthetic apparatus, including chloroplast ultrastructure and chlorophyll synthesis, especially during etioplast-to-chloroplast transition (Cortleven & Schmölling, 2015).

Among the most important processes related to carbon assimilation, cytokinin upregulates protein abundance to exert its role on chloroplast development and function. Cytokinin enhances the expression of plastid-related nuclear genes such as CAB, encoding chlorophyll a binding proteins of photosystem II, and also genes encoding both the small and large Rubisco subunits (Cortleven & Schmölling, 2015; Liu et al., 2017). Furthermore, cytokinin accelerates chlorophyll biosynthesis by promoting synthesis of the precursor 5-aminolevulinic acid, and by enhancing the activity of NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase that converts protochlorophyllide into chlorophyllide (Cortleven & Schmölling, 2015).

It has been hypothesized that growth-promoting effects of exogenous cytokinin in root restricted seedlings could be explained either by increased chlorophyll and/or nitrogen content, ultimately resulting in the promotion of the photosynthetic rate (Di Benedetto et al., 2020c).

Our results show that nitrogen content was mostly affected by plug cell size (Table 5), being quite variable the impact of BAP sprays, and that variation in nitrogen content could only explain changes in carbon fixation at very low N values (i.e., lower than about 0.5 mg·cm⁻², observed in plants raised in the smallest plugs) (Figure 5). In our experiments, because of weekly-applied fertigation, N availability in substrate may be considered as non-limiting, and under these conditions C₃ plants such as lettuce are expected to synthesize large amounts of photosynthetic proteins, which makes photosynthesis limited by Rubisco activity mostly unlikely (Sage & Coleman, 2001).

suministro exógeno de citoquinina (Di Benedetto et al., 2020b). La aplicación de esta hormona, ya sea en etapas previas o tempranas después del trasplante, a menudo revierte la restricción radical al promover la asimilación de carbono, lo cual finalmente resulta en la recuperación del desarrollo de la planta y la acumulación de biomasa, aunque esto puede depender de la severidad de la restricción radical, la concentración de la hormona y el momento de la aplicación de citoquinina (Di Benedetto et al., 2020a). Los datos obtenidos en este trabajo coinciden, en gran medida, con informes de otras especies, ya que se observó un aumento en la acumulación de biomasa de la planta y una promoción del desarrollo del área fotosintética (Cuadro 2) asociado a una producción foliar más rápida y a una mayor área foliar individual.

La disminución del volumen de las celdas (de 128 a 288), por charola de germinación dio lugar a una marcada reducción de los valores de la TAN (Figura 1b) y de la fotosíntesis neta (Figura 3a). Sin embargo, el impacto en la TCR fue, en general, menor (Figura 1a), debido al aumento progresivo de la RAF observado en las plantas cultivadas en celdas más pequeñas (Figura 1c). Por ello, el cambio en la asignación de recursos, priorizando el desarrollo del área foliar, se puede considerar como una respuesta adaptativa que tiende a compensar el fuerte impacto negativo de la restricción radical sobre la fijación de carbono. El deterioro de la asimilación de carbono debido a la restricción de las raíces se ha reportado en cultivos hortícolas y ornamentales como el tomate (Shi, Ding, Dong, Zhou, & Yu, 2008), *pothos* (Di Benedetto et al., 2015b) y *ficus* (Di Benedetto et al., 2020c).

Como se esperaba, la aplicación exógena de citoquinina contrarrestó, en general, el impacto negativo de la restricción radical en el crecimiento de la planta, dando como resultado un mayor desarrollo del área foliar y un mayor crecimiento de la planta que los testigos no tratados (Cuadro 3); principalmente, se observó un aumento de la TAN promedio (Figura 1c) y de la tasa fotosintética neta (Figura 3a). Además, las aspersiones de BAP fueron relativamente más efectivas para promover la TAN en las plántulas cultivadas en las celdas más pequeñas (es decir, las cultivadas en charolas de germinación de 288 celdas). Esto es coherente con las expectativas, ya que se supone que las plantas sometidas a una severa restricción radical producen la menor cantidad de citoquinina, la cual se sintetiza en los ápices de las raíces (Zhang et al., 2014).

Trabajos realizados en otras especies han demostrado que la respuesta de las plantas al aumento de la concentración de BAP suele alcanzar un máximo, lo cual sugiere la existencia de una concentración óptima

Our work also shows that chlorophyll concentration in leaves was not modified by BAP, in either pre- or post-transplant application, irrespective of plug cell size (Table 5). It was also observed that any variation in chlorophyll concentration among treatments was not associated with carbon fixation variables, which contrasts with Croft et al. (2017) suggestion that leaf chlorophyll content may be considered as a proxy for leaf photosynthetic capacity. Although the reason for this apparent discrepancy is not clear, it should be noted that chlorophyll synthesis promotion by cytokinin has been mostly observed in dark grown seedlings (Cortleven & Schmölling, 2015), and that previous studies from our laboratory on greenhouse grown plants of several species have also shown a lack of responsiveness of chlorophyll to BAP sprays (Di Benedetto et al., 2015a). This may be interpreted from an eco-physiological point of view: since maximum daily light intensity values in the present experiments were close to those reported as saturating intensities for lettuce (Wang, Lu, Tong, & Yang, 2016), any further increase in light capture would not be expected to significantly promote photosynthesis.

A further possibility to explain the cytokinin-induced promotion of carbon fixation in root-restricted plants is that morpho-anatomical changes prompted by the hormone may affect carbon diffusion to chloroplasts. In our study, the proportion of intercellular spaces was severely diminished by decreasing plug cell volume, and conversely, BAP induced a remarkable recovery of its values in plants raised in 288-cell trays, particularly in pre-transplant applications (Table 4). This response, together with an increase in leaf thickness often observed in BAP-treated plants (Table 4), determined a large increase in free space volume per unit leaf surface area, which was strongly correlated with photosynthetic rate (Figure 4b) which may help CO₂ diffusion to chloroplasts.

Bosselaers (1983) early addressed the possible association between photosynthesis promotion by cytokinin and increased gas diffusion in his study on *Phaseolus* leaf architectural changes as a consequence of kinetin or BAP application. However, in that study it was concluded that changes due to cytokinin application seemed of little impact on leaf diffusion resistance. Nevertheless, it must be considered that in Bosselaers' study plants were not root-restricted, and that high hormone doses were applied for five consecutive days, which may have increased endogenous cytokinin concentration above optimum levels.

In any case, there is a renewed interest in studies of the leaf anatomy impact on CO₂ diffusion (Evans, Kaldenhoff, Genty, & Terashima, 2009; Kaldenhoff,

de dicha hormona en los tejidos (Araki, Rattin, Di Benedetto, & Miravé, 2007). En concordancia con esto, los resultados obtenidos en este trabajo muestran que al duplicar la concentración de BAP de 50 a 100 mg·L⁻¹ no se observó un efecto significativo en la promoción del crecimiento, encontrándose respuestas similares cuando el BAP se aplicó en cualquiera de las etapas (pre o post-trasplante).

A pesar de promover el desarrollo del área foliar, el tratamiento con BAP produjo una disminución de la RAF, lo cual fue más notable en las plantas cultivadas en las celdas más pequeñas. Dicha disminución se podría atribuir a un mayor crecimiento de las raíces, junto con una menor área foliar específica, que a su vez se asoció con un mayor grosor de las hojas (Cuadro 5) y una mayor concentración de azúcar en las plantas asperjadas, en comparación con los testigos (Cuadro 6). Así, las plantas tratadas con BAP mostraron cambios morfo-fisiológicos que tendieron a compensar los efectos provocados por la restricción radical.

Los procesos fisiológicos involucrados en la promoción del crecimiento mediada por la citoquinina en plantas con raíces restringidas han recibido poca atención. Se sabe que las citoquininas promueven el desarrollo del aparato fotosintético, incluyendo la ultraestructura del cloroplasto y la síntesis de la clorofila, especialmente durante la transición de etioplasto a cloroplasto (Cortleven & Schmölling, 2015).

Entre los procesos más importantes relacionados con la asimilación de carbono, la citoquinina incrementa la abundancia de proteínas para ejercer su papel en el desarrollo y la función del cloroplasto. La citoquinina aumenta la expresión de genes nucleares relacionados con los plastos, como CAB, que codifican las proteínas de unión de la clorofila del fotosistema II, y también los genes que codifican las subunidades pequeñas y grandes de la Rubisco (Cortleven & Schmölling, 2015; Liu et al., 2017). Asimismo, la citoquinina acelera la biosíntesis de la clorofila, promoviendo la síntesis del precursor ácido 5-aminolevulínico y aumentando la actividad de la NADPH:protoclorofilida oxidoreductasa, que convierte la protoclorofilida en clorofilida (Cortleven & Schmölling, 2015).

Se ha planteado la hipótesis de que los efectos promotores del crecimiento de la citoquinina exógena sobre las plántulas con raíces restringidas se podrían explicar por el aumento del contenido de clorofila o de nitrógeno, lo cual, en última instancia, daría lugar a la promoción de la tasa fotosintética (Di Benedetto et al., 2020c).

Los resultados obtenidos muestran que el contenido de nitrógeno se vio afectado principalmente por el tamaño

2012; Han et al., 2018; Ren, Weraduwaage, & Sharkey, 2019; Roig-Oliver et al., 2020) and recent work on the aroid vine *Rhodospatha oblongata* subjected to contrasting light environments emphasizes the impact of thicker leaves with larger spongy parenchyma and increased intercellular spaces on maximum photosynthetic rate (Mantuano, Ornellas, Aidar, & Mantovani, 2021). Thus, the role of cytokinin on changes in leaf anatomy as associated with photosynthetic capacity deserves further studies.

Under non-limiting irradiance conditions, the net photosynthetic rate of C_3 plants is usually limited by CO_2 (Sage & Coleman, 2001), a condition that has likely driven plant evolution (Beerling, 2012). Decades of studies focused on the effect of free air CO_2 enrichment in plant biology have made it evident that C_3 plants, unlike C_4 ones, increase their photosynthetic rate and biomass production (Long, Ainsworth, Leakey, Nösberger, & Ort, 2006; Donohue, Roderick, McVicar, & Farquhar, 2013). In lettuce, CO_2 enrichment (from 355 to 800-900 ppm; from 400 to 800 ppm and from 200 to 1,000 ppm in Mortensen [1994], Kitaya, Niu, Kozai, & Ohashi [1998] and Becker & Kläring [2016], respectively) has shown a promotion of dry mass accumulation in the aerial part ranging from 18 % to more than 100 %, according to experiments.

The possibility that root restriction reversion by cytokinin is mediated by changes in the CO_2 diffusion pathway to chloroplasts is consistent with the fact that several plant responses observed in the present work are similar to those observed in lettuce plants grown under CO_2 enrichment, such as increased leaf thickness (Giri, Armstrong, & Rajashekar, 2016), increased sugar concentration (Becker & Kläring, 2016) and decreased specific leaf area (Kitaya et al., 1998), being the latter a variable that depends on both leaf thickness and metabolite concentration. In our work, a significant correlation between sugar concentration and leaf thickness was found (Figure 6d), which might be associated with osmotic-driven mesophyll cell enlargement.

Besides, increases in sugar concentration and leaf thickness are desirable quality traits in lettuce, especially because they contribute to an extended shelf life (Zhang et al., 2007; Lin et al., 2013).

Lettuce is a very important horticultural crop worldwide and maximizing both production and quality is a central goal to be achieved. Modern production systems may impose stressful conditions that need to be overcome in order to accomplish this goal (Rao, Laxman, & Shivashankara, 2016; Wien & Stützel, 2020). The use of different bio-stimulants have been suggested as alleviators to different abiotic

de la celda (Cuadro 5), siendo significativamente variable el impacto de las aplicaciones de BAP. La variación en el contenido de nitrógeno sólo podría explicar los cambios en la fijación de carbono a valores de nitrógeno muy bajos (es decir, inferiores a $0.5 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-2}$), observados en las plantas cultivadas en las celdas más pequeñas (Figura 5). Debido a la fertirrigación aplicada semanalmente, la disponibilidad de nitrógeno en el sustrato se puede considerar como no limitante, y bajo estas condiciones se espera que las plantas C_3 , como la lechuga, sinteticen grandes cantidades de proteínas fotosintéticas, lo cual hace que la fotosíntesis limitada por la actividad de la Rubisco sea mayormente improbable (Sage & Coleman, 2001).

Adicionalmente, se observó que la concentración de clorofila en las hojas no fue modificada por la BAP, ni en la aplicación previa ni en la posterior al trasplante, independientemente del tamaño de la celda (Cuadro 5). Además, cualquier variación en la concentración de clorofila entre los tratamientos no se asoció con las variables de fijación de carbono, lo cual contrasta con la sugerencia de Croft et al. (2017), ya que afirman que el contenido de clorofila en las hojas se puede considerar como un indicador de la capacidad fotosintética de las mismas. Aunque la razón de esta aparente discrepancia no está clara, hay que tener en cuenta que la promoción de la síntesis de clorofila por parte de la citoquinina se ha observado sobre todo en plántulas cultivadas en oscuridad (Cortleven & Schmölling, 2015), y que estudios realizados con plantas cultivadas en invernadero de varias especies también han mostrado una falta de respuesta de la clorofila a las aspersiones de BAP (Di Benedetto et al., 2015a). Esto se puede interpretar desde un punto de vista eco-fisiológico, ya que los valores máximos de intensidad lumínica diaria en los presentes experimentos estaban cerca de los reportados como intensidades de saturación para lechuga (Wang, Lu, Tong, & Yang, 2016), por lo que no se esperaba que cualquier aumento adicional en la captura de luz promueva significativamente la fotosíntesis.

Otra posible explicación de la promoción de la fijación del carbono, inducida por citoquinina en plantas con raíces con espacio restringido, es que los cambios morfo-anatómicos impulsados por la hormona pueden afectar la difusión del carbono hacia los cloroplastos. En este estudio, la proporción de los espacios intercelulares se vio severamente disminuida al reducir el volumen de las celdas. Por el contrario, la BAP indujo una notable recuperación de sus valores en las plantas cultivadas en bandejas de 288 celdas, particularmente en las aplicaciones previas al trasplante (Cuadro 4). Esta respuesta, junto con un incremento en el grosor de la hoja observado frecuentemente en plantas tratadas con BAP (Cuadro 4),

stresses, including root restrictions during nursery, and many of these compounds contain plant hormones like auxin and cytokinin (Bulgari, Franzoni, & Ferrante, 2019; Di Benedetto et al., 2020a, 2020b).

The present work shows, first, that both production and certain quality attributes of lettuce can be enhanced in root-restricted plants when subjected to a single exogenous application of cytokinin, and secondly, that these responses may be associated with changes in certain leaf anatomical characters that may improve CO₂ diffusion and therefore enhance the photosynthetic capacity of plants.

Conclusions

Carbon assimilation of lettuce seedlings grown in small cells was enhanced by exogenous BAP application and this effect was associated with changes in leaf anatomy such as an increase in the proportion of free air spaces, and an increased leaf thickness, which together may help CO₂ diffusion to chloroplasts. Instead, despite previous assumptions, no changes in chlorophyll concentration were observed while increases in leaf N concentration per unit leaf area appeared to play a relatively minor role. A significant correlation between BAP-driven increases in sugar concentration and leaf thickness was found, which may represent desirable quality traits in this species.

In sum, the present work shows that both production and certain quality attributes of lettuce can be promoted in root-restricted plants when subjected to a single exogenous cytokinin application, in association with leaf anatomical changes that could enhance plant photosynthetic capacity.

Acknowledgements

This work was supported by the University of Buenos Aires Science Program 2018-2020 under Grant 145BA and the University of Mar del Plata Science Program under AGR 555/18.

End of English version

References / Referencias

- Araki, A., Rattin, J., Di Benedetto, A., & Miravé, P. (2007). Temperature and cytokinin relationships on lettuce (*Lactuca sativa* L.) and celery (*Apium graveolens* L.) nursery growth and yield. *International Journal of Agricultural Research*, 2(8), 725-730. doi: ijar.2007.725.730
- Becker, C., & Kläring, H. P. (2016). CO₂ enrichment can produce high red leaf lettuce yield while increasing most flavonoid glycoside and some caffeic acid derivative
- generó un incremento en el volumen del espacio libre por unidad de superficie foliar, el cual estuvo fuertemente correlacionado con la tasa fotosintética (Figura 4b); esto puede ayudar a la difusión del CO₂ hacia los cloroplastos.
- Bosselaers (1983) abordó la posible asociación entre la promoción de la fotosíntesis por la citoquinina y el aumento de la difusión de gases en su estudio sobre los cambios estructurales de las hojas de *Phaseolus* como consecuencia de la aplicación de kinetina o BAP. Sin embargo, en ese estudio se concluyó que los cambios debidos a la aplicación de citoquinina parecían tener poco impacto en la resistencia a la difusión de las hojas. No obstante, hay que considerar que en el estudio de Booselaers las plantas no estaban restringidas radicalmente, y que se aplicaron altas dosis de hormonas durante cinco días consecutivos, lo cual pudo haber aumentado la concentración endógena de citoquinina por encima de los niveles óptimos.
- En cualquier caso, existe interés en estudiar el impacto de la anatomía foliar en la difusión de CO₂ (Evans, Kaldenhoff, Genty, & Terashima, 2009; Kaldenhoff, 2012; Han et al., 2018; Ren, Weraduwege, & Sharkey, 2019; Roig-Oliver et al., 2020). Un trabajo reciente de *Rhodospatha oblongata* sometida a ambientes lumínicos contrastantes enfatiza el impacto de las hojas más gruesas, con parénquima esponjoso más grande y mayores espacios intercelulares, en la tasa fotosintética máxima (Mantuano, Ornellas, Aidar, & Mantovani, 2021). Por ello, el papel de la citoquinina en los cambios de la anatomía foliar asociados a la capacidad fotosintética merece más estudios.
- En condiciones de irradiación no limitante, la tasa fotosintética neta de las plantas C₃ suele estar limitada por el CO₂ (Sage & Coleman, 2001), condición que, probablemente, ha impulsado la evolución de las plantas (Beerling, 2012). Décadas de estudios centrados en el efecto del enriquecimiento de CO₂ en aire libre en la biología de las plantas han puesto de manifiesto que las plantas C₃, a diferencia de las C₄, aumentan su tasa fotosintética y la producción de biomasa (Long, Ainsworth, Leakey, Nösberger, & Ort, 2006; Donohue, Roderick, McVicar, & Farquhar, 2013). En lechuga, el enriquecimiento de CO₂ (de 355 a 800-900 ppm [Mortensen, 1994], de 400 a 800 ppm [Kitaya, Niu, Kozai, & Ohashi, 1998] y de 200 a 1,000 ppm [Becker & Kläring, 2016]) ha mostrado una promoción de la acumulación de masa seca en la parte aérea, que va del 18 al 100 %, dependiendo de los experimentos.
- La posibilidad de que la reversión de la restricción radical por citoquinina se vea mediada por cambios en la vía de difusión del CO₂ hacia los cloroplastos es coherente con el hecho de que varias respuestas de las

- concentrations. *Food Chemistry*, 199, 736-745. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.12.059
- Beerling, D. J. (2012). Atmospheric carbon dioxide: a driver of photosynthetic eukaryote evolution for over a billion years?. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 367(1588), 477-482. doi: 10.1098/rstb.2011.0276
- Boonman, A., Prinsen, E., Gilmer, F., Schurr, U., Peeters, A., Voesenek, L., & Pons, T. L. (2007). Cytokinin import rate as a signal for photosynthetic acclimation to canopy light gradients. *Plant Physiology*, 143(4), 1841-1852. doi: 10.1104/pp.106.094631
- Bosselaers, J. P. (1983). Cytokinin effects on leaf architecture in *Phaseolus vulgaris* L. *Journal of Experimental Botany*, 34(8), 1007-1017. doi: 10.1093/jxb/34.8.1007
- Bulgari, R., Franzoni, G., & Ferrante, A. (2019). Biostimulants application in horticultural crops under abiotic stress conditions. *Agronomy*, 9(6), 306-336. doi: 10.3390/agronomy9060306
- Campolongo, L., Carnelos, D., Miglioli, J. L., Fuginuma, P., Giardina, E., & Di Benedetto, A. (2020). Physiological mechanism involved in the response to four lettuce varieties to a pre-transplant root restriction and a 6, benzyl aminopurine (BAP) spray. *Asian Journal of Agricultural and Horticultural Research*, 5(4), 27-43. doi: 10.9734/AJAHR/2020/v5i430059
- Cortleven, A., & Schmölling, T. (2015). Regulation of chloroplast development and function by cytokinin. *Journal of Experimental Botany*, 66(16), 4999-5013. doi: 10.1093/jxb/erv132
- Croft, H., Chen, J. M., Luo, X., Bartlett, P., Chen, B., & Staebler, R. M. (2017). Leaf chlorophyll content as a proxy for leaf photosynthetic capacity. *Global Change Biology*, 23(9), 3513-3524. doi: 10.1111/gcb.13599
- De Lojo, J., Gandolfo, E., Boschi, C., Giardina, E., & Di Benedetto, A. (2019). Pot cell volume, growing media quality and benzyl aminopurine (BAP) spray effects for nursery growth of *Impatiens walleriana*. *International Journal of Plant Soil Science*, 27(6), 1-13. doi: 10.9734/IJPSS/2019/v27i630091
- Di Benedetto, A., Tognetti, J., & Galmarini, C. (2010). Biomass production in ornamental foliage plants: Crop productivity and mechanisms associated to exogenous cytokinin supply. *American Journal of Plant Science and Biotechnology*, 4(1), 1-22. Retrieved from <https://www.researchgate.net/profile/Adalberto-Di-Benedetto/publication/264311222>
- Di Benedetto, A. (2011). Root restriction and posttransplant effects for bedding pot plants. In: Aquino, J. C. (Ed), *Ornamental plants: types, cultivation and nutrition* (pp. 47-79). New York, USA: Nova Science Publishers, Inc. USA. Retrieved from <https://www.researchgate.net/profile/256678851>
- Di Benedetto, A., Galmarini, C., & Tognetti, J. (2015a). Exogenous cytokinin promotes *Epipremnum aureum* L. growth through enhanced dry weight assimilation rather than through changes in partitioning. *American Journal of Experimental Agriculture*, 5(5), 419-434. doi: 10.9734/AJEA/2015/13398
- Di Benedetto, A., Galmarini, C., & Tognetti, J. (2015b). Effects of combined or single exogenous auxin and/or cytokinin applications on growth and leaf area development in *Epipremnum aureum*. *Journal of*

plantas observadas en el presente trabajo son similares a las reportadas en plantas de lechuga cultivadas bajo enriquecimiento de CO₂, como el aumento del grosor de la hoja (Giri, Armstrong, & Rajashekar, 2016), el aumento de la concentración de azúcar (Becker & Kläring, 2016) y la disminución del área foliar específica (Kitaya et al., 1998), siendo esta última una variable que depende tanto del grosor de la hoja como de la concentración de metabolitos. En el presente trabajo, se encontró una correlación significativa entre la concentración de azúcar y el grosor de la hoja (Figura 6d), lo cual podría estar asociado al agrandamiento de las células del mesófilo impulsado por efecto osmótico. Además, los aumentos en la concentración de azúcar y en el grosor de la hoja son características de calidad deseables en la lechuga, especialmente porque contribuyen a una vida pos-cosecha prolongada (Zhang et al., 2007; Lin et al., 2013).

La lechuga es un cultivo hortícola importante en todo el mundo, y maximizar tanto la producción como la calidad es un objetivo central que se debe alcanzar. Los sistemas de producción modernos pueden imponer condiciones estresantes que deben ser superadas para lograr este objetivo (Rao, Laxman, & Shivashankara, 2016; Wien & Stützel, 2020). Se ha sugerido el uso de diferentes bioestimulantes como mitigadores de estrés abiótico, incluyendo las restricciones radicales durante el almácigo, y muchos de estos compuestos contienen hormonas vegetales, como la auxina y la citoquinina (Bulgari, Franzoni, & Ferrante, 2019; Di Benedetto et al., 2020a, 2020b).

El presente trabajo muestra que la producción y ciertos atributos de la lechuga se pueden incrementar en plantas con raíces restringidas cuando se someten a una aplicación exógena única de citoquinina. Además, dichas respuestas se pueden asociar con ciertas características anatómicas foliares, las cuales pueden mejorar la difusión de CO₂ y, por lo tanto, incrementar la capacidad fotosintética de las plantas.

Conclusiones

La asimilación de carbono de las plántulas de lechuga cultivadas en celdas pequeñas se vio potenciada por la aplicación exógena de BAP. Este efecto se asoció a cambios en la anatomía foliar, como el aumento de la proporción de espacios de aire libre y del grosor de la hoja, que en conjunto pueden favorecer la difusión de CO₂ hacia los cloroplastos. Por el contrario, a pesar de suposiciones previas, no se observaron cambios en la concentración de clorofila, mientras que el aumento de la concentración de nitrógeno en las hojas por unidad de superficie foliar pareció desempeñar un papel relativamente menor. Se encontró una correlación significativa entre el aumento de la concentración de

- Horticultural Science & Biotechnology*, 90(6), 643-654. doi: 10.1080/14620316.2015.11668727
- Di Benedetto, A., & Tognetti, J. (2016). Técnicas de análisis de crecimiento de plantas: su aplicación a cultivos intensivos. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 42(3), 258-282. Retrieved from <https://www.redalyc.org/pdf/864/86449712008.pdf>
- Di Benedetto, A., Galmarini, C., & Tognetti, J. (2018). New insight into how thigmomorphogenesis affects *Epipremnum aureum* L.: Interactions between vine training system and exogenous auxin and cytokinin action in plant development. *Horticulture Brasileira*, 36(3), 330-340. doi: 10.1590/S0102-053620180308
- Di Benedetto, A., Giardina, E., de Lojo, J., Gandolfo, E., & Hakim, G. (2020a). Exogenous benzyl amino purine (BAP) applications for the ornamental pot industry. In: Kortessmäki, S. (Ed), *Cytokinins: biosynthesis and uses* (pp. 1-56). New York, USA: Nova Science Publishers, Inc. Retrieved from <https://novapublishers.com/shop/cytokinins-biosynthesis-and-uses/>
- Di Benedetto, A., Rattin, J., Carnelos, D., Tognetti, J., Lozano-Miglioli, J., Giardina, E., Araki, A., Coro, M., Pico-Estrada, O., Teruel, J., Di Matteo, J., Gerasi, J., Barrera, L., Alonso, E., & Grigoli, L. (2020b). Technological uses of exogenous cytokinins in vegetables. In: Kortessmäki, S. (Ed), *Cytokinins: biosynthesis and uses* (pp. 107-155). New York, USA: Nova Science Publishers, Inc. Retrieved from <https://novapublishers.com/shop/cytokinins-biosynthesis-and-uses/>
- Di Benedetto, A., Galmarini, C., & Tognetti, J. (2020c). Differential growth response of green and variegated *Ficus benjamina* to exogenous cytokinin and shade. *Ornamental Horticulture*, 26(2), 259-276. doi: 10.1590/2447-536x.v26i2.2089
- Dobránszki, J., & Drienyovszki, N. M. (2014). Cytokinin-induced changes in the chlorophyll content and fluorescence of in vitro apple leaves. *Journal of Plant Physiology*, 171(16), 1472-1478. doi: 10.1016/j.jplph.2014.06.015
- Donohue, R. J., Roderick, M. L., McVicar, T. R., & Farquhar, G. D. (2013). Impact of CO₂ fertilization on maximum foliage cover across the globe's warm, arid environments. *Geophysical Research Letters*, 40(12), 3031-3035. doi: 10.1002/grl.50563
- Evans, J. R., Kaldenhoff, R., Genty, B., & Terashima, I. (2009). Resistances along the CO₂ diffusion pathway inside leaves. *Journal of Experimental Botany*, 60(8), 2235-2248. doi: 10.1093/jxb/erp117
- Gandolfo, E., de Lojo, J., Gómez, D., Pagani, A., Molinari, J., & Di Benedetto, A. (2014). Anatomical changes involved in the response of *Impatiens wallerana* to different pre-transplant plug cell volumes and BAP sprays. *European Journal of Horticultural Science*, 79(4), 226-232. Retrieved from https://www.pubhort.org/ejhs/2014/file_4435011.pdf
- Giri, A., Armstrong, B., & Rajashekar, C. B. (2016). Elevated carbon dioxide level suppresses nutritional quality of lettuce and spinach. *American Journal of Plant Science*, 7(1), 246-258. doi: 10.4236/ajps.2016.71024
- Glanz-Idan, N., Tarkowski, P., Turečková, V., & Wolf, S. (2020). Root-shoot communication in tomato plants: cytokinin as azúcar impulsados por el BAP y el grosor de las hojas, lo cual puede representar características de calidad deseables en esta especie.
- En resumen, el presente trabajo muestra que tanto la producción, como ciertos atributos de calidad de la lechuga, pueden ser promovidos en plantas con raíces restringidas cuando son sometidas a una aplicación exógena de citoquinina, en asociación con cambios anatómicos en las hojas que podrían potenciar la capacidad fotosintética de la planta.
- ### Agradecimientos
- Este trabajo fue financiado por el Programa de Ciencia de la Universidad de Buenos Aires 2018-2020 mediante el subsidio 145BA y por el Programa de Ciencia de la Universidad de Mar del Plata mediante AGR 555/18.
- ### Fin de la versión en español
- a signal molecule modulating leaf photosynthetic activity. *Journal of Experimental Botany*, 71(1), 247-257. doi: 10.1093/jxb/erz399
- Gu, J., Li, Z., Mao, Y., Struik, P. C., Zhang, H., Liu, L., Wang, Z., & Yang, J. (2018). Roles of nitrogen and cytokinin signals in root and shoot communications in maximizing of plant productivity and their agronomic applications. *Plant Science*, 274, 320-331. doi: 10.1016/j.plantsci.2018.06.010
- Hakim, G., Gandolfo, E., Giardina, E., & Di Benedetto, A. (2017). The effect of the pre-transplant pot media quality on pansy garden performance. *International Journal of Plant Soil Science*, 19(4), 1-12. doi: 10.9734/IJPSS/2017/36877
- Han, J., Lei, Z., Flexas, J., Zhang, Y., Carriqui, M., Zhang, W., & Zhang, Y. (2018). Mesophyll conductance in cotton bracts: anatomically determined internal CO₂ diffusion constraints on photosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, 69(22), 5433-5443. doi: 10.1093/jxb/ery296
- Hönig, M., Plíhalová, L., Husíčková, A., Nisler, J., & Doležal, K. (2018). Role of cytokinins in senescence, antioxidant defense and photosynthesis. *International Journal of Molecular Science*, 19(12), 4045. doi: 10.3390/ijms19124045
- Inskeep, W. P., & Bloom, P. R. (1985). Extinction coefficients of chlorophyll a and b in N, N-dimethylformamide and 80% acetone. *Plant Physiology*, 77(2), 483-485. doi: 10.1104/pp.77.2.483
- Jordi, W., Schapendonk, A., Davelaar, E., Stoopen, G. M., Pot, C. S., de Visser, R., van Rhijn, J. A., Gan, S., & Amasino, R. M. (2000). Increased cytokinin levels in transgenic P (SAG12)-IPT tobacco plants have large direct and indirect effects on leaf senescence, photosynthesis and N partitioning. *Plant Cell Environment*, 23(3), 279-289. doi: 10.1046/j.1365-3040.2000.00544.x
- Kaldenhoff, R. (2012). Mechanisms underlying CO₂ diffusion in leaves. *Current Opinion in Plant Biology*, 15(3), 276-281. doi: 10.1016/j.pbi.2012.01.011

- Kim, M. J., Moon, Y., Tou, J. C., Mou, B., & Waterland, N. L. (2016). Nutritional value, bioactive compounds and health benefits of lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Journal of Food Composition and Analysis*, 49, 19-34. doi: 10.1016/j.jfca.2016.03.004
- Kitaya, Y., Niu, G. H., Kozai, T., & Ohashi, M. (1998). Photosynthetic photon flux, photoperiod, and CO₂ concentration affect growth and morphology of lettuce plug transplants. *HortScience*, 33(6), 988-991. doi: 10.21273/HORTSCI.33.6.988
- Lee, J. S., Nath, U. K., Goswami, G., & Nou, I. S. (2017). Assessment of different growing conditions for enhanced postharvest quality and shelf-life of leaf lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Agronomy Research*, 15(5), 1944-1955. doi: 10.15159/AR.17.062
- Lin, K. H., Huang, M. Y., Huang, W. D., Hsu, M. H., Yang, Z. W., & Yang, C. M. (2013). The effects of red, blue, and white light-emitting diodes on the growth, development, and edible quality of hydroponically grown lettuce (*Lactuca sativa* L. var. *capitata*). *Scientia Horticulturae-Amsterdam*, 150, 86-91. doi: 10.1016/j.scienta.2012.10.002
- Liu, X., Li, Y., & Zhong, S. (2017). Interplay between light and plant hormones in the control of *Arabidopsis* seedling chlorophyll biosynthesis. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1433. doi: 10.3389/fpls.2017.01433
- Long, S. P., Ainsworth, E. A., Leakey, A. D., Nösberger, J., & Ort, D. R. (2006). Food for thought: lower-than-expected crop yield stimulation with rising CO₂ concentrations. *Science*, 312(5782), 1918-1921. doi: 10.1126/science.1114722
- Mantuano, D., Ornellas, T., Aidar, M., & Mantovani, A. (2021). Photosynthetic activity increases with leaf size and intercellular spaces in an allomorphic lianescent aroid. *Functional Plant Biology*, 48(6), 557-566. doi: 10.1071/FP20215
- Mortensen, L. M. (1994). Effects of elevated CO₂ concentrations on growth and yield of eight vegetable species in a cool climate. *Scientia Horticulturae-Amsterdam*, 58(3), 177-185. doi: 10.1016/0304-4238(94)90149-X
- Muniz-de Oliveira, L., Paiva, R., Ferreira-de Santana, J., Alves, E., Cravo-Nogueira, R., & Dionísio-Pereira, F. (2008a). Effect of cytokinins on in vitro development of autotrophism and acclimatization of *Annona glabra* L. *In Vitro Cellular & Development Biology*, 44(2), 128-135. doi: 10.1007/s11627-008-9119-0
- Muniz-de Oliveira, L., Paiva, R., Aloufa, M. A., Mauro-de Castro, E., Ferreira-de Santana, J., & Cravo-Nogueira, R. (2008b). Effects of cytokinins on the leaf anatomy and growth of *Annona glabra* L. during in vitro and ex vitro culture. *Ciencia Rural*, 38(5), 1447-1451. Retrieved from <https://periodicos.ufsm.br/cr/article/view/57028>
- Ookawa, T., Naruoka, Y., Sayama, A., & Hirasawa, T. (2004). Cytokinin effects on ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and nitrogen partitioning in rice during ripening. *Crop Science*, 44(6), 2107-2115. doi: 10.2135/cropsci2004.2107
- Rao, N. S., Laxman, R. H., & Shivashankara, K. S. (2016). Physiological and morphological responses of horticultural crops to abiotic stresses. In: Srinivasa-Rao, N. K., Shivashankara, K. S., & Laxman, R. H. (Ed), *Abiotic Stress Physiology of Horticultural Crops* (pp. 3-17). New Delhi: Springer. doi: 10.1007/978-81-322-2725-0_1
- Ren, T., Weraduwa, S. M., & Sharkey, T. D. (2019). Prospects for enhancing leaf photosynthetic capacity by manipulating mesophyll cell morphology. *Journal of Experimental Botany*, 70(4), 1153-1165. doi: 10.1093/jxb/ery448
- Richards, D., & Rowe, R. N. (1977). Effects of root restriction, root pruning and 6-nenzylaminopurine on the growth of peach seedlings. *Annals of Botany*, 41(4), 729-740. doi: 10.1093/oxfordjournals.aob.a085347
- Roig-Oliver, M., Bresta, P., Nadal, M., Liakopoulos, G., Nikolopoulos, D., Karabourniotis, G., Bota, J., & Flexas, J. (2020). Cell wall composition and thickness affect mesophyll conductance to CO₂ diffusion in *Helianthus annuus* under water deprivation. *Journal of Experimental Botany*, 71(22), 7198-7209. doi: 10.1093/jxb/eraa413
- Ruffel, S., Krouk, G., Ristova, D., Shasha, D., Birnbaum, K. D., & Coruzzi, G. M. (2011). Nitrogen economics of root foraging: Transitive closure of the nitrate-cytokinin relay and distinct systemic signaling for N supply vs. demand. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 108(45), 18524-18529. doi: 10.1073/pnas.1108684108
- Sage, R. F., & Coleman, J. R. (2001). Effects of low atmospheric CO₂ on plants: more than a thing of the past. *Trends Plant Science*, 6(1), 18-24. doi: 10.1016/S1360-1385(00)01813-6
- Shehata, S. M., Schmidhalter, U., Valšíková, M., & Junge, H. (2016). Effect of bio-stimulants on yield and quality of head lettuce grown under two sources of nitrogen. *Gesunde Pflanzen*, 68(1), 33-39. doi: 10.1007/s10343-016-0357-5
- Shi, K., Ding, X. T., Dong, D. K., Zhou, Y. H., & Yu, J. Q. (2008). Root restriction-induced limitation to photosynthesis in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) leaves. *Scientia Horticulturae-Amsterdam*, 117(3), 197-202. doi: 10.1016/j.scienta.2008.04.010
- Stagnari, F., Galieni, A., & Pisante, M. (2015). Shading and nitrogen management affect quality, safety and yield of greenhouse-grown leaf lettuce. *Scientia Horticulturae-Amsterdam*, 192, 70-79. doi: 10.1016/j.scienta.2015.05.003
- Wang, J., Lu, W., Tong, Y., & Yang, Q. (2016). Leaf morphology, photosynthetic performance, chlorophyll fluorescence, stomata development of lettuce (*Lactuca sativa* L.) exposed to different ratios of red light to blue light. *Frontiers in Plant Science*, 7, 250. doi: 10.3389/fpls.2016.00250
- Warton, D. I., Duursma, R. A., Falster, D. S., & Taskinen, S. (2012). Smatr 3-an R package for estimation and inference about allometric lines. *Methods in Ecology and Evolution*, 3(3), 257-259. doi: 10.1111/j.2041-210X.2011.00153.x
- Wien, H. C., & Stützel, H. (2020). *The physiology of vegetable crops*. USA: CABI. <https://www.cabi.org/bookshop/book/9781786393777/>
- Zhang, F. Z., Wagstaff, C., Rae, A. M., Sihota, A. K., Keevil, C. W., Rothwell, S. D., Clarkson, G. J., Michelmores, E. W., Truco, M. J., Dixon, M. S., & Taylor, G. (2007). QTLs for shelf life in lettuce co-locate with those for leaf biophysical properties but not with those for leaf developmental traits. *Journal of Experimental Botany*, 58(6), 1433-1449. doi: 10.1093/jxb/erm006
- Zhang, K., Novak, O., Wei, Z., Gou, M., Zhang, X., Yu, Y., Yang, H., Cai, Y., Strnad, M., & Liu, C. J. (2014). *Arabidopsis* ABCG14 protein controls the acropetal translocation of root-synthesized cytokinins. *Nature Communications*, 5(1), 1-12. doi: 10.1038/ncomms4274